

**ANTIGENE VERWANDTSCHAFT ZWISCHEN DEM
VIRUS DER VESIKULÄREN SCHWEINEKRANKHEIT
UND ANDEREN PORZINEN ENTEROVIREN SOWIE AUSGEWÄHLTEN
ENTEROVIREN BEI MENSCH UND RIND**

Andrea Amalie Metzger

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
Tübingen
Präsident und Professor Dr. G. Wittmann

vorgelegt über das
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr.

**ANTIGENE VERWANDTSCHAFT ZWISCHEN DEM
VIRUS DER VESIKULÄREN SCHWEINEKRANKHEIT
UND ANDEREN PORZINEN ENTEROVIREN SOWIE AUSGEWÄHLTEN
ENTEROVIREN BEI MENSCH UND RIND**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Andrea Amalie Metzger
aus
Albstadt-Tailfingen

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Universität
München.

Dekan: Univ.- Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.- Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Korreferent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. M. Stangassinger

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1 Die vesikuläre Schweinekrankheit	3
2.1.1 Klinik	3
2.1.2 Epizootologie und Pathogenese	4
2.1.3 Entwicklung der Immunantwort	4
2.1.4 Diagnose	5
2.1.5 Seuchenlage	5
2.1.6 Bekämpfung	5
2.2 Virus der vesikulären Schweinekrankheit und andere Enteroviren	6
2.2.1 Klassifizierung der Enteroviren	6
2.2.2 Biologische Eigenschaften	6
2.2.3 Chemisch-physikalische Eigenschaften	7
2.2.4 Zelluläre Virusvermehrung	8
3. Eigene Untersuchungen	9
3.1 Arbeitskonzept	9
3.2 Material und Methoden	10
3.2.1 Lösungen und Puffer	10
3.2.2 Reagenzien und Geräte	13
3.2.3 Grundmedien	15
3.2.4 Zellen, Kulturbedingungen und Kulturmedien	18
3.2.5 Tiermaterial	19
3.2.6 Untersuchte Virusstämme	20
3.2.7 Virusproduktion	21
3.2.8 Virusreinigung	22
3.2.9 Antiseren	22
3.2.10 Bestimmung der spezifischen Dichte	23
3.2.11 Virustitration	23

3.2.12	Serumneutralisationstest	24
3.2.13	Proteinbestimmung nach Lowry	25
3.2.14	Elektrophoretische Auftrennung viraler Proteine im Polyacrylamidgel	25
3.2.15	Nachweis viraler Proteine durch Western Blotting	26
3.2.16	Replikationsabhängige Markierung von Proteinen mit ^{35}S -Methionin	26
3.2.17	Dissoziation viraler Proteine für die Immunpräzipitation	27
3.2.18	Immunpräzipitation	27
3.2.19	Nachweis radioaktiv markierter gefällter Proteine	27
3.2.20	Molekulargewichtsbestimmung	28
4.	Ergebnisse	29
4.1	Infektionskinetik der untersuchten Virusstämme	29
4.2	Reinigung der untersuchten Virusstämme im Saccharose-Dichte-Gradienten und Bestimmung ihrer spezifischen Dichte	29
4.3	Charakterisierung der Antiseren mittels Neutralisationstest gegen verschiedene Testantigene	31
4.3.1	Spezifität der Antiseren gegen PEV1-11, DS1734 und SVDV	31
4.3.2	Spezifität der Anti-Coxsackie A-, -Coxsackie B- und -ECHO7-Seren	36
4.3.3	Spezifität der ECB0-Antiseren LCR4 und CBV-D	39
4.3.4	Spezifität der SVDV-Antiseren	40
4.4	Untersuchung von Schweinefeldseren	41
4.5	Nachweis viraler Proteine mit spezifischen Antiseren sowie deren Kreuzreaktivität in der Radioimmunpräzipitation und im Western Blot	43
4.5.1	Porzine Enterovirusstämme	43
4.5.2	Bovine Enterovirusstämme	47
4.5.3	Humane Enterovirusstämme	47
4.5.4	SVDV-Isolate	49

5.	Diskussion	78
6.	Zusammenfassung	94
7.	Literaturverzeichnis	98

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
BIS	N',N-Methylen-bis-acrylamid
BSA	bovines Serumalbumin
Ci	Curie
Coxs	Coxsackie
CPE	(cytopathogenic effect) zytopathischer Effekt
d	Dalton
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
ECBO	enteric cytopathogenic bovine orphan
ECHO	enteric cytopathogenic human orphan
ECSO	enteric cytopathogenic swine orphan
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FKS	fötales Kälberserum
g	Gravitationskonstante
h	Stunde
HELA	epitheloid carcinoma, cervix human
Hepes	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-äthan-sulfonsäure
K	Kilodalton ($\times 10^3$ d)
KID	kulturinfektiöse Dosis
mA	Milliampere
MEM	minimal essential medium
Min	Minute
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
ND	neutralisierende Dosis
NP	Nonidat P40
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PEV	porzines Enterovirus
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIP	Radioimmunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure

RPMI	Leukozytenmedium nach Moore u. Mitarb. 1957
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMEDI	stillbirth mumification embryonic death infertility
SVD	Swine Vesicular Disease
SVDV	Swine Vesicular Disease Virus
TPB	Tryptose-Phosphat-Broth
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpolyäthylenglykoläther
U	Umdrehungen
V	Volt

1. Einleitung

Die vesikuläre Schweinekrankheit (swine vesicular disease, SVD), welche sich von der Maul- und Klauenseuche klinisch nicht unterscheidet, ist seit 1981 in der Bundesrepublik Deutschland anzeigepflichtig. Seit dem letzten SVD-Ausbruch 1985 wird die Bundesrepublik Deutschland als SVD-freies Land eingestuft.

Bei Exportuntersuchungen von Schweinen treten jedoch immer wieder niedrige Antikörpertiter gegen das Virus der vesikulären Schweinekrankheit auf, ohne daß diese serologisch positiven Fälle mit dem klinischen Bild der Krankheit korreliert sind. Ähnliche Beobachtungen wurden in England von Golding u. Mitarb. (38) gemacht, wobei ebenfalls SVDV-Antikörper-positive Tiere ohne das Auftreten des klinischen Bildes ermittelt wurden. Die Autoren vermuteten eine Kreuzreaktivität zwischen SVD-Virus und anderen porcinen Enteroviren. Für das Auftreten von SVDV-Antikörper-positiven Tieren in Japan wurde von Kodama u. Mitarb. (54) eine Wechselwirkung mit dem menschlichen Cocksackie B5-Virus diskutiert. Monlux und Mitarb. (69) infizierten Schweine mit SVD- und Cocksackie B5-Virus und stellten Veränderungen im zentralen Nervensystem von gleichem neuropathologischen Bild und Ausbreitungsmodus fest. Die klinischen Symptome nach SVDV-Infektion überwogen jedoch diejenigen nach Cocksackie B5-Infektion.

Das Virus der vesikulären Schweinekrankheit gehört dem Genus Enterovirus der Familie der Picornaviridae an. Zu demselben Genus werden die ubiquitär (102) verbreiteten Enteroviren beim Schwein gezählt, von denen bisher 11 Serotypen beschrieben wurden (25,26,49,51), weiterhin die beim Menschen vorkommenden Cocksackie- und ECHO-Viren und verschiedene beim Rind vorkommende Enteroviren. Brown et al. beschrieben 1976 eine starke serologische Verwandtschaft und RNA-Homologie zwischen verschiedenen Isolaten von SVD-Virus und Cocksackie B5-Virus (12,14).

Neben induzierten Infektionen von Schweinen mit Cocksackie B5 im Tierversuch (69), wurden Übertragungen von SVD-Virus auf den Mensch beschrieben (15). So kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Übertragung dieser Viren vom Menschen auf das Tier von epidemiologischer Bedeutung sein könnte.



Ziel der Arbeit war zu klären, ob die bei gesunden Schweinen festgestellten SVDV-Antikörper spezifisch sind oder durch serologische Kreuzreaktionen mit anderen Enteroviren bedingt werden. Weiterhin wurde die SVDV-Spezifität der viralen Proteine untersucht, da mit Hilfe von nicht kreuzreaktiven viralen Proteinen eine spezifische Diagnose der SVD möglich wäre.

2. Schrifttum

2.1. Die vesikuläre Schweinekrankheit

Die vesikuläre Schweinekrankheit ist eine akut verlaufende, fieberhafte, zyklische Virusinfektionskrankheit. Sie ist durch das Auftreten von Aphten an der Rüsselscheibe, der Zunge, auf der äußeren Haut des Gesäuges, sowie im Klauenbereich, am Metakarpus und Metatarsus gekennzeichnet (4).

Die ersten Ausbrüche traten 1966 in Italien auf, wo der Erreger von Nardelli u. Mitarbeitern isoliert und beschrieben wurde (71), 1971 folgten Ausbrüche in Hongkong (41), 1972/73 in Großbritannien (70), später in Polen, Österreich, der Schweiz, Frankreich, Italien und in der Bundesrepublik Deutschland (23,58,,73).

2.1.1. Klinik

Im akuten Verlauf kommt es nach einer Inkubationszeit von 2-7 Tagen zum Auftreten von Sekundärblasen im Bereich des Kronsauumes, an einer oder mehreren Klauen und an der Rüsselscheibe. Multiple, später konfluierende Sekundärblasen folgen nach weiteren 1-2 Tagen im Interdigitalspalt, am Klauensaum, im Sohlenbereich, auf der Zunge, der Rüsselscheibe, dem Nasenrücken und auf der äußeren Haut des Gesäuges.

Mit dem Auftreten der Primärblasen geht eine starke Temperaturerhöhung bis 42°C einher, die 3-4 Tage anhalten kann. Das klinische Erscheinungsbild ist durch Appetitlosigkeit, Lahmheiten, gespannten Gang und gelegentlich durch zentralnervöse Störungen mit Paresen und Paralyse gekennzeichnet. Neben dieser typischen akuten Verlaufsform tritt immer mehr die klinisch inapparente Form in den Vordergrund, bei der eine Aphtenbildung ausbleibt und lediglich eine Temperaturerhöhung erfolgt. Die Mortalitätsrate der vesikulären Schweinekrankheit beträgt 10-90%, wobei die Letalität mit 1-5% gering ist (4,63,71).

Bei trächtigen Sauen sind zwischen der 6. und 8. Woche der Trächtigkeit Aborte festgestellt worden (24).

2.1.2. Epizootologie und Pathogenese

Neben der direkten Übertragung durch Kontakt von Tier zu Tier kann das Virus indirekt durch Fleisch und Fleischprodukte, kontaminierte Stallgeräte sowie durch den Menschen übertragen werden, wobei z.B. ungekochte Küchenabfälle eine wichtige Rolle spielen.

Nach oraler Aufnahme vermehrt sich das Virus vermutlich im oberen Digestionstrakt, wo es zur Bildung von Primärblasen kommt. Anschließend erfolgt eine Generalisierung mit Infektion des Lymphgewebes sowie Ansiedlung auf Haut und Schleimhäuten. Dort kommt es zur Bildung von Aphten, die stark mit Lymphe gefüllt sind. Nach dem Platzen der Aphten kommt es zu rascher Epithelisierung. Der Infektionsverlauf ist nach 3-4 Wochen abgeschlossen, kann allerdings durch Sekundärinfektionen kompliziert werden (4).

2.1.3. Entwicklung der Immunantwort

Burrows u. Mitarb. (17) stellten ab dem 7. Tag neutralisierende Antikörper fest, wobei der höchste Titer 28 Tage nach Infektion ermittelt werden konnte. Ähnliche Beobachtungen, jedoch mit geringerem Titeranstieg als bei einer Infektion mit klinischem Bild, wurden auch bei subklinischer Infektion gemacht.

Nach Überstehen der Krankheit können neutralisierende Antikörper mindestens 60 Tage lang ermittelt werden (17). Neben neutralisierenden wurden auch präzipitierende Antikörper nachgewiesen (18).

Während bei Poliovirus von den vier viralen Strukturproteinen die Proteine VP1, VP2 und VP3 für die Induktion neutralisierender Antikörper verantwortlich sind (21,96) und bei Coxsackieviren dem VP2 diese Eigenschaft zugeschrieben wird (3), werden bei SVDV sowohl durch VP1, wie auch durch VP2 neutralisierende Antikörper induziert (97).

2.1.4. Diagnose

Die Diagnose wird durch Erregernachweis in der Zellkultur, sowie durch serologische Nachweisverfahren wie die Komplementbindungsreaktion, den Serumneutralisationstest und die ELISA-Technik gestellt.

2.1.5. Seuchenlage

Die Bundesrepublik Deutschland gilt als frei von vesikulärer Schweinekrankheit. Nach den Tierseuchenberichten waren seit 1980 insgesamt fünf Ausbrüche von SVD zu verzeichnen. Im September 1981 trat SVD in Freudenstadt auf, gefolgt von zwei weiteren Ausbrüchen am gleichen Ort in den Monaten Juli/August 1982. Die letzten Ausbrüche wurden in den Monaten Oktober/November 1985 im Emsland registriert.

2.1.6. Bekämpfung

Die vesikuläre Schweinekrankheit unterliegt der Anzeigepflicht nach §9 des Tierseuchengesetzes in der Fassung vom 28. März 1980 (95). Aus differentialdiagnostischen Gründen wird die SVD hinsichtlich der amtlichen Bekämpfungsmaßnahmen der Maul- und Klauenseuche gleichgestellt. Erkrankte Schweinebestände werden gekeult. Nach der Verordnung über Sperrbezirke bei "Vesikulärer Schweinekrankheit" und "Ansteckender Schweinelähmung" (99) legt die Behörde das Gebiet um den befallenen Bestand oder sonstigen Standort mit einem Radius von mindestens 3 km als Sperrbezirk fest. Schweine dürfen nur mit Genehmigung der Behörde und nur zur sofortigen Schlachtung, für diagnostische Zwecke oder zur sofortigen Tötung und unschädlichen Beseitigung aus dem Sperrbezirk verbracht werden.

Nach der Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen dürfen Tiere nur verladen werden, wenn sie aus einer SVD-seuchenfreien Zone stammen (76), dasselbe gilt für den Handel mit frischem Fleisch und Fleisch-erzeugnissen (77).

2.2. Virus der vesikulären Schweinekrankheit und andere Enteroviren

2.2.1. Klassifizierung der Enteroviren

Das Virus der vesikulären Schweinekrankheit gehört zu der Familie der Picornaviridae. Diese wird unterteilt in die Geni Enterovirus, Cardiovirus, Rhinovirus und Aptovirus.

Zu der Gattung Enterovirus gehören u.a. die Gruppe der menschlichen Polioviren, die Gruppe der Coxsackieviren, die ECHO-, ECSO- und ECBO-Viren sowie das Virus der vesikulären Schweinekrankheit.

2.2.2. Biologische Eigenschaften

In Zellkulturen verläuft die Vermehrung von Enteroviren mit der Ausbildung eines für Picornaviren typischen zytopathischen Effekts.

Porzine Enteroviren vermehren sich in primären Schweinenierenzellen mit einem zytopathischen Effekt (9). Nach Adaptation können sie auch auf verschiedenen Zelllinien wie PS-EK-, PK15-, und IBRS2-Zellen angezogen werden. In vivo zeigen Enteroviren eine starke Affinität zu den Zellen des Gastrointestinaltrakts. Verschiedene Isolate vermehren sich auch in Nerven- und Muskelzellen.

Schweineenteroviren sind die Ursache für die ansteckende Schweinelähmung (Teschener Krankheit; Talfan disease). Die Teschener Krankheit ist in der Bundesrepublik Deutschland eine anzeigepflichtige Tierseuche und ist klinisch durch eine nichteitrige Polioencephalomyelitis gekennzeichnet. Die Talfan-Erkrankung ist eine auf den Gastrointestinaltrakt beschränkte mildere Verlaufsform.

Verschiedene Enterovirustypen sind am intrauterinen Fruchttod beteiligt und wurden im Zusammenhang mit dem SMEDI-Syndrom isoliert (24).

Menschliche Enteroviren zeichnen sich ebenfalls durch ihre Affinität zum Gastrointestinaltrakt und teilweise zum Zentralnervensystem aus. Es sind bisher 72 verschiedene Enterovirus-Serotypen bekannt (82). Neben den drei Poliomyelitisvirustypen existieren 23 Typen des

Coxsackievirus A, 6 Typen des Coxsackievirus B, 32 ECHO-Serotypen, sowie die humanen Enteroviren 68-71 und das Hepatitis A-Virus, welches als Enterovirus Typ 72 klassifiziert wurde.

Coxsackieviren lassen sich durch ihre größere Pathogenität für Baby-mäuse von den übrigen Enteroviren abtrennen. Sie werden aufgrund ihrer Veränderungen in der Babymaus in zwei Gruppen unterteilt:

- Coxsackieviren der Gruppe A induzieren eine diffuse Myositis mit akuter Entzündung und Nekrosen der Muskelfibrillen,
- Coxsackieviren der Gruppe B rufen eng umgrenzte Degenerationen im Gehirn, fokale Nekrosen in der Skelettmuskulatur und Entzündungen im Fettgewebe, im Pankreas und gelegentlich im Myokard hervor (56).

Beim Menschen verlaufen Coxsackievirusinfektionen in der Regel mild, einige werden mit verschiedenen klinischen Syndromen in Verbindung gebracht.

Bei Neugeborenen treten Fälle von Myokarditiden auf, beim Erwachsenen werden aseptische Meningitiden, Herpangina, Myalgien sowie paralytische Erkrankungen und respiratorische Symptome beschrieben.

Alle Virustypen können unspezifische fieberhafte Erkrankungen hervorrufen (15).

ECHO-Viren befallen primär Epithelzellen des oberen Digestions- und Respirationstrakts. Die Infektion kann zur Generalisierung mit Fieber, Hautausschlag und zentralnervösen Störungen führen (101).

Rinderenteroviren lassen sich aus dem Kot gesunder Tiere isolieren. Sie können neben Enteritiden und respiratorischen Erscheinungen auch Vaginitiden hervorrufen (91,92). Insgesamt wurden bisher 8 Serotypen klassifiziert.

2.2.3. Chemisch-physikalische Eigenschaften

Enteroviren haben im elektronenmikroskopischen Bild die Form eines Ikosaeders. Der Durchmesser des Virions beträgt 22-35 nm mit einem Molekulargewicht von $2,5 \times 10^6$ Dalton und sedimentiert mit 156 s (82). Auf jeder der 60 Dreiecksseiten des Ikosaeders befindet sich nur ein

Monomer, zugleich Kapsomer, bestehend aus immer gleichen Protein-Untereinheiten, welche durch die 4 viralen Strukturproteine VP1-VP4 gebildet werden. Im Kapsid sind daneben noch Reste des VP0 enthalten, des Vorläuferproteins für VP2 und VP4.

Die Molekulargewichte der Polio-Strukturproteine werden für VP0 mit 37K, VP1 mit 34K, VP2 mit 30K, VP3 mit 26K und für VP4 mit 7K angegeben (57). Tsuda u. Mitarb. (97) ermittelten für SVD-Japan 1/73 Molekulargewichte von 37K für VP0, 33K für VP1, 29K für VP2 und 32K für VP3.

Enteroviren weisen nach vierstündiger Säurebehandlung eine pH-Resistenz im Bereich von pH 3,0 bis pH 9,0 auf. Sie sind stabil gegenüber Chloroform und Äther und haben eine spezifische Dichte von $1,33-1,34 \text{ g/cm}^3$ im Cäsiumchloridgradienten.

Durch Erhitzen auf 56°C für 30 Minuten werden Enteroviren zu 90 % inaktiviert, eine Behandlung über 9 Stunden inaktiviert sie vollständig (8).

Die RNA des unbehüllten Virus besitzt die gleiche Polarität wie eine mRNA. Sie ist an ihrem 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende kovalent mit dem viralen Protein VPg verknüpft (50).

2.2.4. Zelluläre Virusvermehrung

Nachdem das Viruspartikel mittels Translokation durch die Zellmembran in die Zelle gelangt, werden die Kapside innerhalb der Lysosomen durch lysosomale Enzyme abgebaut. Diesem Prozeß des Uncoating folgt der Transport der einzelsträngigen Nukleinsäure in den Zellkern, wo die virale RNA mit Hilfe der viruseigenen Polymerase repliziert wird und an die Ribosomen wandert. Da die Virus-Nukleinsäure als positiver Strang vorliegt, kann sie dort selbst als mRNA fungieren und translatiert werden.

Bei Picornaviren wird von der RNA nur ein großes Polyprotein kodiert (MW 210 000), welches durch eine virale Proteinase in die Proteine P1, P2, und P3 prozessiert wird. Die Proteine P2 und P3 sind die Vorläufer der nichtstrukturellen Proteine wie z.B. der viralen Proteinase 3C, der Proteinase 2A und der Polymerase 3D. Das Vorläuferprotein P1 wird in die Strukturproteine VP1, VP3 und VP0 gespalten, wobei das letztere nach erneuter Spaltung in VP2 und VP4 übergeht (57).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Arbeitskonzept

Um die serologische Kreuzreaktivität des Virus der vesikulären Schweinekrankheit mit porzinen Enteroviren, ECBO- und ECHO-Viren zu untersuchen, wurden spezifische Immenser in Kaninchen hergestellt. Dazu ist jedes Virusisolat vermehrt und über einen Saccharosegradienten aufgereinigt worden. Das native ultrabeschallte Virus wurde in Kaninchen intrakutan injiziert.

Im Serumneutralisationstest wurden diese Seren auf Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen Oberflächenantigene des homologen Antigens überprüft. Im Kreuzneutralisationstest ist untersucht worden, ob diese neutralisierenden Antikörper auch Epitope auf Viruspartikeln heterologer Isolate erkennen.

Nach Ermittlung der kreuzreaktiven neutralisierenden Aktivität der einzelnen Seren sollte deren Eigenschaft spezifische virale Proteine zu erkennen getestet werden.

Dazu wurden zwei verschiedene Methoden verwendet:

-Im Western Blot wurden nach Dissoziation der Viruspartikel die Proteine im Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen, mit dem Kaninchen-Antiserum inkubiert sowie über ein Peroxidase-gekoppeltes Ziegen-anti-Kaninchenserum mittels Substratlösung nachgewiesen.

-Bei der Radioimmunpräzipitation wurde radioaktiv markiertes Antigen entweder als vollständige Viruspartikel oder in dissoziierter Form mit dem Antiserum inkubiert. Mit Hilfe von Protein A-tragenden Staphylokokkus aureus Zellen wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe abzentrifugiert und die spezifisch erkannten Proteine nach Dissoziation der Komplexe im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die gefällten Proteine wurden durch photographische Auswertung nachgewiesen.

Abschließend wurden die heterolog erkannten Proteine mit den homologen

Reaktionsmustern sowie der Reaktion im Neutralisationstest verglichen.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Lösungen und Puffer

Laemmli-Gel-Zusammensetzungen

Trenngel

30 % Acrylamid + 0,8 % BIS	14,74 ml
1,5 M Tris-HCL pH 8,8	11,00 ml
Aqua dest.	17,60 ml
10 % SDS	0,44 ml
TEMED	22 µl
10 % Ammoniumperoxidsulfat	0,145 ml

Sammelgel

BIS-Acrylamid	1,1 ml
Tris-HCL pH 6,8	2,75 ml
Aqua dest.	6,93 ml
10 % SDS	0,11 ml
TEMED	5,5 µl
Ammoniumperoxidsulfat	0,11 ml

Vor der Zugabe von TEMED und Ammoniumperoxidsulfat wurden die Lösungen entgast.

Lösungen zur Proteinbestimmung nach Lowry

Reagenz A:

Na_2CO_3	20 g
NaOH	4 g
in 1 l Aqua dest.	

Reagenz B:

B₁: 1 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$

B₂: 2 % K-Tartrat

Reagenz B setzt sich aus gleichen Teilen B1 und B2 zusammen.

Reagenz C:

50 ml Reagenz A + 1 ml Reagenz B

Folinreagenz:

5 ml Aqua dest. + 8 ml Folin

Amidoschwarzlösung für Nitrozellulose

45 % Aqua dest.

45 % Methanol

10 % Essigsäure

0,1 % (G/V) Amidoschwarz

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

pH 8,3

in Aqua dest.

für SDS-PAGE zusätzlich 0,1 % SDS

Entfärber für Amidoschwarz-behandelte Nitrozellulose

90 % Methanol

8 % Aqua dest.

2 % Essigsäure

Entfärber für gefärbte Polyacrylamidgele

7,5 % Essigsäure

5,0 % Methanol

in Aqua dest.

Färbelösung für Polyacrylamidgele

45 % Methanol

10 % Essigsäure

0,25 % (G/V) Serva Blau

in Aqua dest.

PBS (pH 7,4)

140 mM NaCl
2,7 mM KCl
6,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
1,5 mM KH_2PO_4
0,7 mM CaCl_2
0,5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

PBS-A

Siehe PBS, ohne CaCl_2 und $\text{MgCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$

Reduzierender Probenpuffer für SDS-PAGE

130 mM Tris HCl (pH 6,8)
4 % SDS
20 % Glycin
0,01 % Bromphenolblau
10 % 2-Mercaptoäthanol

Renaturierungspuffer für SDS-PAGE

4 M Harnstoff
50 mM NaCl
10 mM Tris HCl (pH 7)
0,1 mM DTT
in Aqua dest.

Substratlösung zum Anfärben der Nitrozellulosestreifen:

1 ml Chloronaphthol (3 mg/ml Äthanol)
5 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,6
4 ml PBS-A
5 μl H_2O_2
10 ml pro Streifen

Saccharoselösung zur Gradientenreinigung

300 mg Saccharose werden in 500 ml Aqua bidest. gelöst und danach steril filtriert.

Waschlösungen für Nitrozellulose

0,1 % Triton in PBS-A

1 M NaCl in PBS

Lysis-Puffer für RIP

100 ml Aqua dest. enthalten:

2 M Tris	0,5 ml
5 M NaCl	3,0 ml
1 % Na-Desoxycholsäure	1,0 g
0,1 % SDS	0,1 g
2 mM Methionin	0,03 g
1 mg/ml Ovalbumin	0,1 g
0,02 % NaN_3	0,2 ml
1 mM PMSF	1,0 ml
0,05 % NP 40	0,1 ml
1 mM DTE	2,5 ml

Saccharose-Lösung für RIP

1 M Saccharose in 100 ml Lysis-Puffer

Proteinfixierlösung für RIP

10 % Essigsäure

40 % Methanol

in Aqua dest.

3.2.2. Reagenzien und Geräte

Chemikalien

Acrylamid	Serva
Ammoniumperoxidsulfat	Merck
4-Chloro-1-Naphthol	Sigma
DTT	Serva
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck
Glycin	Merck
Hepes	Serva
2-Mercaptoäthanol	Merck
BIS	Serva

SDS
Serva-Blue-R (Coomassie)
TEMED
Tris
Triton X-100
Agarose
Bromphenolblau
Methanol
Äthanol
L-Glutamin
Methionin
PMSF
Ovalbumin
NaN₃
NP40
Autoradiography Enhancer, EN³HANCE

Matheson
Serva
BioRad
Merck
Serva
Difco
Serva
Merck
Merck
Merck
Serva
Serva
Sigma
Merck
Polysciences Inc.
New England Nuclear

Biologische Präparate

Bovines Serumalbumin
Fötales Kälberserum
SDS-PAGE Molekulargewicht-Protein-
Standard-Marker gefärbt bzw. ungefärbt
Peroxidase gekoppeltes Kaninchen Anti-
Ziege IgG F(ab')₂ Fragment

Freund'sches Adjuvans komplett
Freund'sches Adjuvans inkomplett

Sigma
Boehringer

BioRad

Jackson Immuno-
research
Difco
Difco

Radioaktive Substanzen

³⁵S-Methionin (>1000 Ci/mMol)
¹⁴C-Marker

Amersham-Buchler
Amersham-Buchler

Geräte

Kühlzentrifuge
Laborzentrifuge ZK 364
Ultrazentrifuge Centrikon T-2055
Tischzentrifuge 5414 S
Thermostat 5320

Stock
Hermle
Kontron
Eppendorf
Eppendorf

Rotor TST 28	Kontron
Sterilbank Laminar Flow	Ceag Shirp
Brutschrank	Bergmann
CO ₂ -Begaser Auto Zero	Heraeus Christ
Mikroskop Standard	Zeiss
Aufsetzkamera MC 63	Zeiss
Spektrophotometer 240	Gilford
Vertikal-Gelelektrophoresesystem	BFAV-Anfertigung
Horizontal-Elektrophoresesystem	BFAV-Anfertigung
Geltrockner	Hoefler-Scientific
Zellulosetubes für TST 28	Kontron
Mikrotiterplatte, 96-Loch, Flachboden	Costar
Zellkulturplatte, 24-Loch, 16 mm ø	Costar (Cluster ²⁴)
Gewebekulturflasche, 250 ml	Greiner
Gewebekulturflasche, 50 ml	Miles Laboratories
PS-Röhrchen, 14 ml	Greiner
Petrischalen	Greiner
Nitrozellulose-Membranfilter BA 83, 0,2 µm	Schleicher & Schüll
Filterpapier 3 mm	Whatman
Gelbfilter B + W 36	Zeiss
Fotolampen Video 300 S	Osram
Elektrophoresespannungsgerät "2301 Macrodrive 1"	LKB Bromma
Transferspannungsgerät "Model 200/2.0"	BioRad
Gradientenmischgerät	BFAV-Anfertigung
Gradientenabnahmegerät	BFAV-Anfertigung
Röntgenfilmkassetten 24 x 30 cm	Agfa Gevamatc
Röntgenfilme X-Omat S	Kodak
Entwickler	Sakura

3.2.3. Grundmedien

RPMI 1640-Medium

Zusammensetzung:

Anorganische Salze

Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O

mg\l

100

KCL	400
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	100
NaCl	6000
NaHCO ₃	2000
Na ₂ HPO ₄	800
Aminosäuren	
L-Arginin x HCl	242
L-Asparagin	50
L-Asparaginsäure	20
L-Cystin	50
L-Glutamin	300
L-Glutaminsäure	20
Glycin	10
L-Histidin x HCl	18,2
L-Hydroxyprolin	20
L-Isoleucin	50
L-Leucin	50
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	15
L-Prolin	20
L-Serin	30
L-Threonin	20
L-Tryptophan	5
L-Tyrosin	20
L-Valin	20
Vitamine	
p-Aminobenzoessäure	1
Biotin	0,2
Cholinchlorid	3
Folsäure	1
i-Inosit	35
Nicotinamid	1
Panthothensäure-Ca-Salz	0,25
Pyridoxin x HCl	1
Riboflavin	0,2
Vitamin B ₁₂	0,005

Andere Komponenten

Glucose	2000
Glutathion	1
Phenolrot	5

MEM nach Eagle

Zusammensetzung:

Anorganische Salze	mg\l
CaCl ₂	200
KCl	400
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200
NaCl	6800
NaHCO ₃	2200
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	140

Aminosäuren	mg\l
L-Arginin HCl	126
L-Cystin	24
L-Glutamin	292
L-Histidin HCl	42
L-Isoleucin	52,5
L-Leucin	52,4
L-Lysin HCl	73
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	32
L-Threonin	48
L-Tryptophan	10
L-Valin	46
L-Tyrosin	36

Vitamine

Cholinchlorid	1
Folsäure	1
i-Inosit	2
Panthothensäure Ca-Salz	1
Pyridoxal HCl	0,1
Thiamin	1

Andere Komponenten	
Glucose	1000
Phenolrot	10
TPB	2,95 %
Aqua bidest	

Den Medien für die Zellkulturen wurden zum Gebrauch 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 µg/ml Gentamycin zugesetzt.

3.2.4. Zellen, Kulturbedingungen und Kulturmedien

Porzine Zellen

PS-EK-Zelllinie (39), freundlicherweise erhalten von Dr. Heß, BFAV Tübingen.

Kulturmedium für die PS-EK-Zelllinie

10 % TPB
10 % Fötale Kälberserum
80 % MEM-Medium nach Eagle

Die Zellen inkubierten in einem CO₂-Brutschrank bei 5 % CO₂, 37°C und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Humane Zellen

HeLa-Zellen

Die Zelllinie wurde 1951 von Gey, Coffmann und Kubicek aus einem Zervixkarzinom einer Frau gewonnen. Es handelt sich um einen epitheloiden Zelltyp, freundlicherweise erhalten von Herrn Prof. O.C. Straub, BFAV Tübingen.

Kulturmedium für die HeLa-Zelllinie

RPMI 1640-Medium
2 mM L-Glutamin
10⁻⁵ M 2-Mercaptoäthanol
18 mM Hepes
10 % fötales Kälberserum

Die Zellen inkubierten in einem CO₂-Brutschrank bei 5 % CO₂, 37°C und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

3.2.5 Tiermaterial

Kaninchen

Zur Herstellung der Immunseren dienten uns Kaninchen aus der Zucht der BFAV.

Schweine

Die Schweine wurden vom Versuchsgut der Universität Hohenheim bezogen.

3.2.6. Untersuchte Virusstämme

Virusstamm	Herkunftsland	isoliert von
<u>ECSO</u>		
PEV 1 (Talfan)	England	Harding et al. 1957 (41)
2 (T80)	England	Betts 1960 (8)
3 (02b)	USA	Kasza und Adler 1965 (49)
4 (PS36)	USA	Dunne et al 1967 (25)
5 (F26)	England	Alexander und Betts 1967 (1)
6 (PS37)	USA	Dunne et al. 1967 (25)
7 (F43)	England	Alexander und Betts 1967 (1)
8 (V13)	England	Lamont und Betts 1960 (60)
9 (UKG410/73)	Schottland	Knowles et al. 1979 (51)
10 (LP54)	England	Knowles et al. 1979 (51)
11 (UKG173/74)	England	Knowles et al. 1979 (51)
DS1734	Deutschland	erhalten vom VUA Neumünster, 1987
<u>SVDV</u>		
SVD UKG 72/27	England	Dawe et al. 1973 (20)
SVD 6629	Deutschland	erhalten von Dr. Heß, BFAV
SVD BFAV	Deutschland	SVD-Laborstamm der BFAV
<u>ECBO</u>		
CBV-D	USA	erhalten von Prof. Straub, BFAV, Straub 1965 (92)
LCR4	Deutschland	erhalten von Prof. Straub, BFAV, Straub und Bögel 1964 (91)

Virusstamm	Herkunftsland	isoliert von
<u>ECHO</u>		
ECHO7	Deutschland	erhalten vom Landesunter- suchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern in Oberschleißheim
<u>Coxsackie</u>	Deutschland	erhalten vom Landesunter- suchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayern in Oberschleißheim
Coxs A9		
A16		
B1		
B2		
B3		
B4		
B5		
B6		

3.2.7. Virusproduktion

Die Vermehrung für den Virusstock erfolgte auf 25 cm²-Plastikkulturflaschen mit konfluentem Zellrasen. Hierzu wurde das Kulturmedium bis auf ca 5 ml abgeschüttet, 200 µl der Viruslösung dazugegeben und mit der Zellkultur 45 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurden 30 ml des Zellerhaltungsmediums dazugegeben, welches 1 % FKS enthielt.

Die Zellkulturen wurden täglich im Durchlichtmikroskop auf die Ausbildung eines zytopathischen Effekts kontrolliert. Nach vollständigem zytopathischen Effekt wurde der Inhalt der Kulturflasche abgenommen und 10 Min. bei 2000 g und 4°C in der Stockzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in 500 µl-Portionen weggefroren und diente als Virusstock für den Neutralisationstest und für weitere Virusvermehrung.

3.2.8. Virusreinigung

Pro Isolat wurden 4 Rouxflaschen mit je 500 µl der Virusvorratslösung infiziert.

Nach Ausbildung eines zytopathischen Effekts wurde der Inhalt in der Stockzentrifuge bei 400 g und 4°C vorgereinigt. Zur Gewinnung des Viruspellets wurde der Überstand 4 h bei 4°C und 28 000 U/Min. im TST 28.3-Rotor zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet eines 1" x 3,5" Zelluloseröhrchens in 500 µl PBS aufgenommen.

Die eigentliche Virusreinigung erfolgte über einen Saccharosegradienten.

Hierzu wurden eine 40 %ige und eine 20 %ige Saccharoselösung in PBS hergestellt, von denen über ein Gradientenmischgerät ein 20-40 %iger kontinuierlicher Gradient in 1" x 3,5" Zelluloseröhrchen aufgebaut wurde.

Auf jedes Zelluloseröhrchen wurde 1 ml des in PBS aufgenommenen Viruspellets aufgetragen und bei 25 000 U/Min. und 4°C für 4 h im TST 28.3-Rotor zentrifugiert.

Die Gradienten wurden mit einem Gradientenabnahmeggerät durchleuchtet und die Virusbanden durch seitliches Anstechen der Zelluloseröhrchen mittels einer 0,8 x 35 mm-Kanüle mit aufgesetzter Spritze abgenommen. Von jeder Virusbande wurde mittels eines Spektrometers die Dichte bestimmt.

Das Bandenmaterial wurde mit PBS aufgefüllt in Zelluloseröhrchen bei 28 000 U/Min. und 4°C für 4 h im TST 28.3-Rotor endpelletiert. Die einzelnen Pellets wurden in 500 µl PBS aufgenommen und bei -70°C eingefroren.

3.2.9. Antiseren

Herstellung von spezifischen Immunseren in Kaninchen

Zur Infektion der Kaninchen wurden 400 µg des gereinigten Virus in 400 µl PBS aufgenommen, mit der gleichen Menge Freund'schem Adjuvans vermischt und 5 sec ultrabeschallt (Sonifier B30, Stufe 7).

Die Injektion erfolgte auf Höhe des Schultergelenks im Bereich der 10. Rippe. Dazu wurde ein ungefähr fünfmarkstückgroßer Bereich geschoren, desinfiziert und die Lösung an mehreren Stellen intrakutan mit einer

0,8 x 35 mm-Kanüle injiziert.

Vor der ersten Immunisierung wurde von jedem Kaninchen Nullserum gewonnen. Danach erfolgte die erste Injektion mit komplettem Freund'schem Adjuvans, 14 Tage darauf wurde das erste Immunserum gewonnen und auf seinen Antikörpergehalt getestet.

Die zweite Immunisierung erfolgte nach dem gleichen Schema, wobei dem Antigen nun inkomplettes Freund'sches Adjuvans im Verhältnis 1:1 zugefügt wurde.

Das zweite Immunserum wurde wiederum nach 14 Tagen gewonnen und der Titer bestimmt, um eventuell eine Drittimmunisierung vorzunehmen. Bei Erreichen eines genügend hohen homologen Titors wurde nach 5-7 Tagen eine Herzpunktion zur Gewinnung großer Serummengen vorgenommen.

Nach 6 Monaten wurden von den Kanichen ohne vorherige Immunisierung nochmals Serum gewonnen, um die Entwicklung des Antikörpertiters nach dieser Zeitspanne zu untersuchen.

Vor Verwendung im Neutralisationstest wurden die Seren 30 Min. bei 56°C im Wasserbad inaktiviert.

Schweineseren

Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität von Schweinefeldseren mit SVDV und Coxsackie B5, A9 sowie A16 verwendeten wir bereits vorgetestete Feldseren aus der Diagnostik der BFAV, die uns freundlicherweise Herr Dr. Haas zur Verfügung stellte.

3.2.10. Bestimmung der spezifischen Dichte

Die spezifische Dichte der Enterovirusstämme wurde anhand eines Spektrophotometers bestimmt. Dazu wurde von jeder im Gradientendurchleuchtungsgerät sichtbaren Virusbande ein Tropfen abgenommen und deren spezifische Dichte ermittelt.

3.2.11. Virustitration

Zur Ermittlung des Virustiters wurde eine Titration der einzelnen Isolate vorgenommen. Hierzu wurde eine $\log_{10}$ -Verdünnungsreihe mit 8 Verdünnungsstufen in Röhrchen angelegt. Von jeder Verdünnungsstufe

wurden 2 Proben von jeweils 100 µl pro Vertiefung auf eine 96-er Mikrotiterplatte übertragen.

Anschließend wurden 30 000 Zellen in 100 µl Medium pro Vertiefung verimpft und der Titrationsansatz bei 37°C inkubiert. Der Verlauf des zytopathischen Effekts wurde täglich im Durchlichtmikroskop kontrolliert und der Testansatz nach 5 Tagen endabgelesen. Der Virustiter wurde nach Kärber (47) als $KID_{50}/100 \mu l$ berechnet.

3.2.12. Serumneutralisationstest

Das Serum wurde in $\log_4$ -Stufen in Verdünnungsmedium mit 2 % FKS verdünnt. Aus jeder Verdünnung wurden Doppelansätze von 50 µl pro Vertiefung auf die Mikrotiterplatte übertragen. Als Virusarbeitslösung wurden 100 kulturinfektiöse Einheiten (KID_{50}) des Virus in 50 µl Zellkulturmedium mit 2 % fötalem Kälberserum angesetzt. 50 µl der Serumverdünnung und 50 µl der Virusarbeitslösung wurden zusammen 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 30 000 Zellen in 100 µl Medium pro Vertiefung. Der Test wurde bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem CO_2 -Inkubator aufbewahrt.

Auf die ECSO-, ECB0-, und SVDV-Isolate wurden PS-EK-Zellen, auf die Coxsackiestämme und ECHO7 HeLa-Zellen verimpft. Dem Zellsuspensionsmedium wurde 10 % FKS zugefügt.

Die Kontrolle der Virusarbeitslösung erfolgte durch Zugabe von Verdünnungsmedium im Verhältnis 1:1 und nachfolgende Titration in $\log_{10}$ -Verdünnungsstufen. Als Zellkontrolle wurden anstelle des Serum-Virus-Gemisches 100 µl Verdünnungsmedium zugegeben. Eine Auswertung erfolgte nur bei Einsatz einer Virusarbeitslösung mit 70-130 $KID_{50}/50 \mu l$. Der Testansatz wurde im Durchlichtmikroskop auf Ausbildung eines zytopathischen Effekts beobachtet. Zur Berechnung des Neutralisationstitors (ND_{50}) diente die Methode nach Behrens und Kärber (47). Die Zellqualität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden durch Mitführen einer standardisierten Virustitration und eines standardisierten Antiserums überprüft.

3.2.13 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry und Mitarb. (62).

Zur Durchführung wurden zunächst die Reagenzien A,B,C und das "Phenolreagenz nach Folin" (Zusammensetzung siehe Lösungen) hergestellt. Es wurden 30 µl der Proteinlösung in ein Röhrchen einpipetiert, mit 50 µl 10 %igem DOCA gemischt und mit Reagenz C auf 4 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 0,4 ml des verdünnten Folinreagenz und kräftigem Schütteln wurde die Probe 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte mittels Spektrophotometer bei einer Extinktion von 660 nm. Zur Erstellung der Eichkurve wurden je 2 Proben mit 5, 10, 15, 20, 30, 50, 75, 100 µg BSA hergestellt und deren Proteingehalt bestimmt. Dabei wurden die Extinktionen der BSA-Standardproben auf der Ordinate und deren Proteingehalt auf der Abszisse abgetragen. Der Proteingehalt der Testproben wurde im Schnittpunkt von Extinktion und Standardkurve ermittelt.

3.2.14. Elektrophoretische Auftrennung viraler Proteine im Polyacrylamidgel

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10 %igen Polyacrylamidgel (1,5 x 160 x 150 mm) nach Laemmli (59). Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Sammelgel aufgetragen, in welches mittels eines Gelkamms 14 Taschen von je 10,5 mm² anlegt wurden. In jede Tasche wurde eine Proteinmenge zwischen 0,10-0,15 µg/mm² aufgetragen. Die Proben wurden zur PAGE in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen, 5 Min. bei 95°C aufgeköcht und danach in die Taschen aufgetragen. Die Mitführung einer standardisierten Molekulargewichtsmarkerspür ermöglichte die Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine.

Die PAGE für den Western Blot erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 38 mA über 4.15 Stunden.

Die PAGE zur Radioimmunpräzipitation erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 Volt über 12 Stunden.

3.2.15. Nachweis viraler Proteine durch Western Blotting

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine 30 Minuten in Renaturierungspuffer inkubiert und anschließend 30 Minuten in Elektrophoresepuffer ohne SDS äquilibriert.

Der Proteintransfer auf Nitrozellulose erfolgte in einer horizontalen Blotting-Apparatur, in welcher das Gel und die Nitrozellulose zwischen 2 Schwämmen und 2 Whatmanfiltern eingespannt wurden. Der elektrophoretische Transfer dauerte 2 Stunden bei 0,84 A.

Nach dem Transfer wurde das Gel mit Coomassieblau gefärbt, anschließend durch 7,5 % Methanol und 5 % Essigsäure in Aqua dest. entfärbt. Die Nitrozellulose wurde in 2 % igem bovines Serumalbumin (BSA) in PBS inkubiert, um die freien Proteinbindungsstellen der Nitrozellulose abzusättigen.

Die den Spuren auf dem Gel entsprechenden Streifen der Nitrozellulose wurden zurechtgeschnitten und über Nacht mit dem Antigen-spezifischen Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Streifen 30 Minuten in PBS-A-Triton, 5 Min. in 5 M NaCl-Lösung und nochmals 30 Min. in PBS-A-Triton gewaschen, danach mit dem zweiten Antikörper für 2 Stunden inkubiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen in PBS-A-Triton von 30 Min. wurden die Streifen mittels einer Chloro-naphthol-Substratlösung und H_2O_2 angefärbt. Nachdem die Proteinbanden deutlich angefärbt waren, wurde in PBS abgestoppt.

3.2.16. Replikationsabhängige Markierung von Proteinen mit ^{35}S -Methionin

In Gewebekulturschälchen einer 24-er Platte (Durchmesser 16 mm) dicht gewachsene Zellen wurden nach vollständiger Abnahme des Zellkulturmediums mit dem jeweiligen Virusisolat infiziert (10 MOI/Zelle) und nach 45 Min. Adsorption des Virus in 1 ml frischem Zellkulturmedium mit 1 % FKS weiterinkubiert. Acht bis zwölf Stunden vor Auftreten eines zytopathischen Effekts wurde das Zellkulturmedium abgenommen und der Ansatz in MEM ohne Methionin unter Zusatz von 20 μCi ^{35}S -Methionin/ml und 1 % FKS inkubiert. Nach Auftreten des zytopathischen Effekts wurde Kulturüberstand bei Zellstärke pelletiert. Pellet und Zellrasen einer-

seits sowie Kulturüberstand andererseits wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C eingefroren.

3.2.17. Dissoziation viraler Proteine für die Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation vollständiger viraler Partikel wurden Pellet und Zellrasen 15 Min. in Lysis-Puffer mit 0,1 % SDS, 0,05 % NP-40 und 1 mM Dithiothreitol inkubiert.

Zur Immunpräzipitation dissoziierter viraler Proteine wurden die Proben in Lysis-Puffers mit 1 % SDS bei 95°C für 5 Min. aufgekocht. Vor der Reaktion mit dem Antikörper bzw. Antiserum mußte die SDS-Konzentration durch Verdünnen mit SDS-freiem Lysis-Puffer wieder auf eine Konzentration von 0,1 % gebracht werden, um die Ausbildung eines Antigen-Antikörperkomplexes zu ermöglichen.

Zur Zerstörung der zellulären DNA wurden die Proben ca. 5 sec. ultraschallt (Sonifier B30, Stufe 7) und anschließend zentrifugiert.

3.2.18. Immunpräzipitation

Hierzu wurden 40 μl der Probe aus 3.2.17. mit 20 μl des zu testenden Antiserums 1 Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden den Antigen-Antikörper-Komplexen 50 μl einer Suspension von Protein A-tragenden, fixierten Staphylokokkus aureus-Zellen zugegeben und der Ansatz über Nacht auf Eis inkubiert. Die an Bakterien gebundenen Komplexe wurden in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 12 000 U/Min. abzentrifugiert und 4 x gewaschen. Die Endreinigung erfolgte mittels Pelletierung über 1 M Saccharose in Lysis-Puffer. Das Pellet wurde in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C aufgekocht, bei 12 000 U/Min. pelletiert und 20 μl des Überstandes auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.2.19. Nachweis radioaktiv markierter gefällter Proteine

Nach der PAGE wurden die Proteine 1 Stunde in 10 % Essigsäure und 40 % Methanol in Aqua dest. fixiert. Nach Verstärkung der Radioaktivität

mittels Enhance, wurden die Gele gewässert und 2 Stunden bei 70°C im Gelrockner auf einem Whatman-Filter getrocknet. Die zur Autoradiographie vorbereiteten Gele wurden in eine Agfa-Filmkassette eingelegt, auf die Gele ein Röntgenfilm gelegt und bei -70°C exponiert. Die Filme wurden nach einer Exposition von mindestens 3 Tagen und maximal 3 Wochen entwickelt.

3.2.20. Molekulargewichtsbestimmung

Zur Bestimmung der Molekulargewichte viraler Proteine nach SDS-PAGE wurde anhand der Markerproteine eine Eichkurve erstellt, wobei deren bekannte Molekulargewichte auf der Ordinate und deren Lauflänge (cm) im Gel auf der Abszisse abgetragen wurden. Die Molekulargewichte der viralen Proteine konnten im Schnittpunkt der Laufstrecke im Gel mit der Standardkurve auf der Ordinate abgelesen werden.

4. Ergebnisse

4.1. Infektionskinetik der untersuchten Virusstämme

Die Ausbildung eines zytopathischen Effektes sowie das Auftreten eines signifikanten Titeranstiegs erfolgte bei den einzelnen Virusisolaten nach Infektion mit 1 MOI zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

PEV8, PEV10, PEV11 sowie das Feldisolat DS1734, die beiden bovinen Enterovirus-Isolate, alle drei SVDV-Isolate sowie Cocksackie B1, B5 und B6 zeigten eine signifikante Virusvermehrung bereits 9-12 Stunden nach Infektion. Mit PEV1-7 sowie Cocksackie A9, A16 und B2 wurde eine signifikante Virusvermehrung erst zwischen 12 und 24 Stunden, mit PEV9, Cocksackie B3, B4 und ECH07 erst zwischen 24 bis 36 Stunden nach Infektion ermittelt.

4.2. Reinigung der untersuchten Virusstämme im Saccharose-Gradienten und Bestimmung ihrer spezifischen Dichte

Tabelle 1 zeigt die spezifischen Dichten aller untersuchten Enteroviren.

Bei vielen Virusisolaten traten im Gradienten zwei virale Banden auf. Von jeder viralen Bande wurde die spezifische Dichte bestimmt, welche bei allen untersuchten Enterovirusstämmen im Bereich von 1.369-1.381 g/cm³ lag.

Tab.1 Spezifische Dichte der untersuchten Enteroviren
(g/cm³)

Virusstamm	obere Virusbande	untere Virusbande
ECS0		
PEV1	1,37	1,38
PEV2		1,38
PEV3	1,37	1,374
PEV4	1,37	1,374
PEV5	1,369	1,374
PEV6		1,38
PEV7		1,38
PEV8	1,378	1,38
PEV9	1,379	1,381
PEV10	1,375	1,379
PEV11		1,38
DS1734	1,38	1,381
SVDV		
SVD UKG 72/27	1,38	1,381
SVD 6629	1,378	1,381
SVD BFA		1,38
ECB0		
CBV-D	1,374	1,376
LCR4		1,38
ECHO		
ECHO7	1,379	
<u>Coxsackie-Stämme</u>		
Coxs A9		1,38
Coxs A16		1,38
Coxs B1		1,38
Coxs B2	1,379	1,38
Coxs B3		1,38
Coxs B4		1,38
Coxs B5		1,38
Coxs B6		1,38

4.3. Charakterisierung der Antiseren mittels Neutralisationstest gegen verschiedene Testantigene

4.3.1. Spezifität der Antiseren gegen PEV 1-11, DS1734 und SVDV

Wie aus Tabelle 2 (S.32/33) ersichtlich, sind von jedem Serotyp der porzinen Enteroviren 1-11, DS1734 und SVDV vier Immunseren gegen die Antigene PEV1-11, DS1734 und SVDV auf kreuzneutralisierende Aktivität getestet worden. Das mit (1) gekennzeichnete Erstimmunserum wurde 14 Tage nach Erstimmunisierung der Kanichen gewonnen. Nach erneuter Immunisierung wurde das Zweitimmunserum (2) getestet und bei geringen homologen Titern eine weitere Immunisierung vorgenommen. Dies erfolgte bei den Kaninchen, die mit den Antigenen PEV9, PEV10 und DS1734 immunisiert waren. Das Drittimmunserum ist in Tabelle 2 mit (3) gekennzeichnet. Soweit mit dem Zweitimmunserum ein guter Antikörpertiter erhalten wurde, erfolgte nach etwa 5-7 Tagen die Herzpunktion der Kaninchen zur Gewinnung größerer Serummengen. Dieses Serum ist mit (Hp) gekennzeichnet. Um die Antikörperentwicklung zu verfolgen, wurde sechs Monate nach der letzten Immunisierung eine weitere Serumprobe gewonnen (6M).

Die Tests sind meist wiederholt und die Titer als 50% neutralisierende Dosis (ND_{50}) berechnet worden. In der Tabelle sind die Mittelwerte angegeben.

Antiserum PEV1

Nach Immunsierung stiegen die homologen neutralisierenden Antikörpertiter bis 1:65.536 an. Sechs Monate später wurden noch Titer von 1:2.048 ermittelt. Kreuzreaktive Antikörpertiter von $\geq 1:32$ waren gegen PEV3, PEV6, PEV9 und DS1734 nachweisbar.

Antiserum PEV2

Es wurden homologe Titer bis 1:16.384 erreicht, nach sechs Monaten fiel der Titer auf 1:2.048. Kreuzreaktive Titer $\geq 1:32$ wurden gegen PEV1 und PEV6 festgestellt.

Legende zu Tab. 2 (S.32/33):

/1: Erstimmunserum; /2: Zweitimmunserum; /3: Drittimmunserum;

Hp: Herzpunktion; M: Monate; Ag: Antigen; AS: Antiserum;

Tab. 2

AS	Ag	PEV 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	UKG 72	BFA	8629	DS1734
1/	1	65.536	<2	8	<2	8	128	8	<2	8	8	4	<2	<2	<2	512
2	2	8.192	8	32	4	16	32	8	<2	64	4	<2	<2	<2	<2	128
HP	HP	8.192														32
6M	6M	2.048														8
2/	2	64	16.384	8	16	4	16	8	<2	16	4	<2	<2	<2	<2	8
2	2	8.192														8
HP	HP	<2	16.384	16	8	16	32	8	4	16	8	8	<2	<2	<2	8
6M	6M	2.048					8						<2	<2	<2	8
3/	1	32	8	8.192	8	16	256	8	8	4	4	4	<2	<2	<2	8
2	2	32.768	<2	32.768	<2	8	16	16	<2	8	4	<2	<2	<2	<2	<2
HP	HP	<2		2.048									<2	<2	<2	<2
6M	6M												<2	<2	<2	<2
4/	1	8	128	8	>131.072	<2	64	<2	4	<2	8	64	<2	<2	<2	128
2	2	8	256	8	131.072	16	128	8	<2	<2	<2	<2	<2	4	<2	<2
HP	HP		64		32.768		8						<2	<2	<2	<2
6M	6M				16.384								<2	<2	<2	<2
5/	1	16	32	8	4	65.536	32	8	<2	8	8	16	<2	<2	<2	<2
2	2	32	8	8	8	32.768	32	8	<2	<2	8	8	<2	<2	<2	4
HP	HP												<2	<2	<2	<2
6/	1	8	8	8	8	8	16.384	8	8	4	4	4	<2	<2	<2	<2
2	2	8	8	8	8	8	8.192	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
HP	HP						8.192						<2	<2	<2	<2
6M	6M						2.048						<2	<2	<2	<2
7/	1	8	<2	8	<2	8	<2	32.768	16	16	8	8	<2	<2	<2	4
2	2	8	4	32	<2	8	4	131.072	<2	<2	8	<2	<2	<2	<2	4
HP	HP			<2				32.768					<2	<2	<2	4
6M	6M							8.192					<2	<2	<2	4
8/	1	32	8	8	8	8	8	8	4.096	<2	2.048	16	8	4	8	8
2	2	8	8	32	8	8	8	8	512	<2	256	8	<2	4	<2	8
HP	HP			8					32		128		<2	<2	<2	8
6M	6M								8				<2	<2	<2	8

Fortsetzung Tab. 2

[illegible]

Antiserum PEV3

Das Zweitimmunserum wies Titer von 1:32.768 auf, die sechs Monate später auf 1:2.048 abgefallen waren. Kreuzreaktive Titer $\geq 1:32$ traten gegen PEV1 und PEV6 auf.

Antiserum PEV4

Nach Immunisierung wurden Titer von $>1:131.072$ erreicht. Nach sechs Monaten konnten noch Titer von 1:16.384 festgestellt werden. Kreuzreaktive Antikörpertiter von $\geq 1:32$ konnten gegen PEV2, PEV6, PEV11 und DS1734 ermittelt werden.

Antiserum PEV5

Nach Immunisierung mit PEV5 wurden Titer bis 1:65.536 festgestellt. Eine Titerbestimmung nach sechs Monaten konnte bei diesem Kaninchen nicht vorgenommen werden, da es vor diesem Zeitpunkt verendet war. Kreuzreaktive Titer $\geq 1:32$ waren gegen PEV1, PEV2, PEV6 vorhanden.

Antiserum PEV6

Es wurden Titer bis 1:16.384 ermittelt, die nach sechs Monaten auf 1:2.048 abfielen. Kreuzreaktive Titer von $\geq 1:32$ wurden gegen keines der Antigene festgestellt.

Antiserum PEV7

Die homologen Titer lagen nach Zweitimmunisierung bei 1:131.072. Nach sechs Monaten wurden Titer von 1:8.192 festgestellt. Kreuzreaktive Titer $\geq 1:32$ traten gegen PEV3 auf.

Antiserum PEV8

Es wurden homologe Titer bis 1:4.086 festgestellt, die nach sechs Monaten bis auf 1:8 abfielen. Kreuzreaktive Titer von $\geq 1:32$ waren gegen PEV1 und PEV3 vorhanden. Gegen PEV10 waren die Kreuzneutralisationstiter ab dem zweiten Serum höher als die entsprechenden homologen Titer; nämlich nach sechs Monaten noch 1:128 gegenüber 1:8.

Antiserum PEV9

Nach der dritten Immunisierung wurden Titer von 1:2.048 erhalten, welche nach sechs Monaten noch bei 1:256 lagen. Gegen PEV7 lagen kreuzreaktive Antikörpertiter von $\geq 1:32$ vor.

Antiserum PEV10

Auch nach Drittimmunisierung stiegen die Titer nicht über 1:128 an. Nach sechs Monaten wurden nur noch Titer von 1:16 ermittelt. Die kreuzreaktiven Titer gegen PEV8 beliefen sich auf $\geq 1:32$.

Antiserum PEV 11

Nach Zweitimmunisierung wurden Titer von 1:1.024 erreicht. Kreuzreaktive Titer von $\geq 1:32$ traten gegen PEV3, PEV6 und PEV9 auf, gegen DS1734 erreichten sie sogar einen Wert von 1:1.024.

Antiserum DS1734

Die Immunisierung führte zu Antikörpertitern von $\leq 1:32.768$. Sechs Monate später betrugen diese noch 1:16.384. Kreuzreaktive Titer $\geq 1:32$ wurden gegen PEV1, PEV2, PEV3 und PEV6 erhalten.

Mit folgenden Antiseren gegen porcine Enteroviren wurden kreuzreaktive Titer gegen SVDV bis 1:32 ermittelt: anti-PEV4-Serum gegen SVD BFA, anti-PEV8-Serum gegen alle drei Isolate von SVDV, anti-PEV11-Serum gegen SVD UKG 72/27 und SVD BFA sowie anti-DS1734-Serum gegen SVD BFA.

4.3.2. Spezifität der Anti-Coxsackie A, -B und -ECHO7-Seren

Tab. 3 (S.37) enthält die Ergebnisse gegen die SVDV- und Coxsackieantigene sowie das ECHO7-Antigen, Tab. 4 (S.38) die Kreuzreaktivität der neutralisierenden Antikörper gegen die Antigene PEV1-PEV11 und DS1734.

Coxsackie A9

Während das Erstimmunserum homologe Titer von 1:256 und gegen Coxsackie A16 sowie Coxsackie B5 kreuzreaktive Titer von 1:512 zeigte, stiegen die Titer nach der zweiten Immunisierung gegen die beiden A-Serotypen auf 1:2.048, gegen B5 sogar auf 1:8.192 an. Gegen die übrigen Antigene der Coxsackie B-Reihe sowie des ECHO7 wurden keine neutralisierenden Antikörpertiter nachgewiesen.

Coxsackie A16

Die homologen Titer unterschieden sich nicht von jenen gegen A9. Gegen Coxsackie B5 erreichte das erste Serum einen Titer von 1:128, der mit dem Zweitserum auf 1:8 abfiel. Mit den anderen getesteten Antigenen traten keine Reaktionen auf.

Coxsackie B1

Die homologen Titer gingen bis 1:4.096. Mit Ausnahme von Coxsackie B6 (1:4) wurden gegen die weiteren Antigene keine Titer >1:2 gefunden.

Coxsackie B2

Der homologe Titer stieg auf $\leq$ 1:2.048. Gegen Coxsackie B1 wurde mit dem Zweitimmunserum ein Titer von 1:8.192 erreicht. Mit Ausnahme von Coxsackie B3 waren Titer von 1:8 gegen Coxsackie B4, B5, B6 und ECHO7 nachweisbar.

Coxsackie B3

Die Immunisierung erbrachte lediglich homologe Titer bis zu 1:128 und einen heterologen Titer von 1:16 gegen Coxsackie B1. Kreuzreaktive Antikörpertiter ($\geq$ 1:32) ergaben sich gegen ECHO7.

Coxsackie B4

Mit Coxsackie B4-Antigen wurden homologe Titer bis 1:8.192 erreicht. Heterologe Titer traten gegen Coxsackie B1 (1:8) und B6 (1:4) auf.

Tab. 3

AS	Ag	UKG 72	BFA	6629	Coxs A9	Coxs A16	Coxs B1	Coxs B2	Coxs B3	Coxs B4	Coxs B5	Coxs B6	ECHO 7
	SVD UKG 72/HP	16.384	8.192	8.192	8.192 2.048	8.192 2.048	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 16	2.048 2.048	<2 <2	<2 <2
	SVD BFA/HP	16.384	16.384	65.536	8.192 8.192	4.096 8.192	<2 <2	<2 <2	<2 <2	128 32	16.394 8.192	<2 <2	<2 <2
	SVD 6629/HP	8.192	1.024	16.384	2.048 2.048	2.048 2.048	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 8	2.048 2.048	<2 <2	<2 <2
	Coxs A 9/1	128 2.048	512 512	128 1.028	256 2.048	512 2.048	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	512 8.192	<2 <2	<2 <2
	Coxs A16/1	32 32	128 64	8 16	256 512	128 512	<2 8	<2 <2	<2 <2	<2 <2	128 8	<2 <2	<2 <2
	Coxs B 1/1	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	8 4.096	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 4	<2 <2
	Coxs B 2/1	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 4	<2 8	32 8.192	32 2.048	<2 <2	<2 8	<2 8	<2 8	<2 8
	Coxs B 3/1	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 16	<2 <2	8 128	<2 <2	<2 <2	<2 <2	8 32
	Coxs B 4/1	8 16	16 8	32 16	<2 <2	<2 <2	8 8	4 <2	<2 <2	2.048 8.192	<2 <2	4 4	<2 <2
	Coxs B 5/1	512 512	128 256	128 64	2.048 32.768	2.048 32.768	<2 <2	<2 <2	<2 <2	8 8	4.096 32.768	<2 <2	<2 <2
	Coxs B 6/1	<2 <2	<2 <2	<2 <2	8 <2	8 <2	<2 <2	<2 <2	8 <2	8 <2	8 <2	128 16.384	8 <2
	ECHO 7/1	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	<2 <2	64 32	<2 <2	<2 <2	<2 <2	128 512

Tab. 4

AS \ Ag	PEV 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	DS 1734
Coxs A 9/2	8	2	8	<2	8	4	<2	16	<2	4	<2	<2
A16/2	16	8	8	8	16	8	8	8	32	8	16	8
B 1/2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
B 2/2	8	<2	<2	<2	<2	4	4	4	8	8	4	<2
B 3/2	<2	<2	<2	<2	4	<2	<2	4	4	4	8	<2
B 4/2	32	16	16	4	8	8	<2	8	8	4	4	16
B 5/2	8	8	8	8	8	8	8	<2	4	4	8	8
B 6/2	8	4	4	4	<2	8	8	8	32	<2	<2	4
ECHO 7/2	8	8	8	8	8	8	8	4	8	4	4	16

Coxsackie B5

Nach Immunisierung wurden homologe Titer bis zu 1:32.768 erreicht. In selber Höhe wurden kreuzreaktive Titer gegen Coxsackie A9 und A16 ermittelt.

Coxsackie B6

Die homologen Titer betrugen nach Zweitimmunisierung 1:16.384. Signifikante Kreuzreaktivitäten konnten nicht festgestellt werden.

ECHO7

Es wurden homologe Titer von 1:512 sowie kreuzreaktive Titer von $\geq 1:32$ gegen Coxsackie B3 ermittelt.

Eine Neutralisation gegenüber SVDV zeigten die Seren von Coxsackie A9, A16, B4 und B5. Das Coxsackie A9-Serum zeigte kreuzreaktive Titer gegen SVD UKG 72/27 (1:2.048), gegen SVD 6629 (1:1.024) und gegen SVD BFA (1:512). Coxsackie A16-Serum reagierte mit SVD BFA (1:128), SVD UKG 72/27 (1:32) und SVD 6629 (1:16). Coxsackie B4-Serum zeigte Titer bis 1:32 gegenüber allen drei SVDV-Isolaten. Coxsackie B5-Serum reagierte mit SVD UKG 72/27 (1:512), mit SVD BFA (1:256) und mit SVD 6629 (1:128).

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität der Coxsackie- und ECHO7-Antiseren gegenüber porzinen Enteroviren wurden die Zweitimmunseren gegen PEV1-11 und DS1734 ausgetestet. Wie aus Tabelle 4 (S.38) ersichtlich, kann zusammenfassend festgestellt werden, daß nur bei zwei Coxsackie-Serotypen ein Titer von $\geq 1:32$ gegen die einzelnen PEV-Antigene auftrat. Es handelt sich hierbei um ein Coxsackie B4-Antiserum mit einem Titer von 1:32 gegen PEV1 und ein Coxsackie B6-Antiserum mit einem Titer von 1:32 gegen PEV9.

4.3.3. Spezifität der ECBO-Antiseren LCR4 und CBV-D

LCR4-Antiserum

Die homologen Titer und die Titer gegen CBV-D stiegen nach Zweitimmunisierung auf 1:16.384 an. Gegen alle Isolate von SVD-Virus waren keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar.

CBV-D-Antiserum

Es wurden homologe Titer bis 1:65.536 erreicht. Titer von $\leq 1:8.192$ waren gegen LCR4 nachweisbar. Gegen alle SVD-Virus-Isolate lagen die Titer unter 1:2.

4.3.4. Spezifität der SVDV-Antiseren

Antiserum SVD UKG 72/27

Die homologen Titer gingen bis $\leq 1:16.384$ (Tabelle 2, S.32/33). Gegen die anderen SVD-Isolate wurden Titer von 1:2.048 bis $> 1:131.072$ erreicht, wobei höhere Titer als gegen das homologe Antigen gegen SVD 6629 auftraten. Kreuzreaktive Titer von Werten $\geq 1:32$ wurden gegen PEV3 und PEV9 ermittelt.

Die Neutralisationstiter gegen Coxsackie B4 betrugen 1:16, gegen Coxsackie A9 und A16 1:8.192 und gegen Coxsackie B5 1:2.048 (Tabelle 3, S.37).

Antiserum SVD BFA

Die homologen Titer bewegten sich zwischen 1:8.192 und 1:16.384. Höhere kreuzreaktive Titer wurden gegen SVD UKG 72/27 mit 1:32.768 und gegen SVD 6629 mit 1:65.536 erreicht. Titer $\geq 1:32$ wurden gegen PEV5, PEV7, PEV9 erhalten. Gegen die anderen Antigene lagen die Titer meist zwischen 1:4 und 1:16 (Tabelle 2, S.33).

Kreuzreaktive Neutralisationstiter traten gegen Coxsackie B4 (1:128), Coxsackie A9 und A16 (1:8.192) und Coxsackie B5 (1:16.394) auf.

Antiserum SVD 6629

Die Immunisierung führte zu homologen Titern bis 1:131.072. Titer bis zu 1:8.192 traten gegen SVD UKG 72/27 und SVD BFA auf. Titer $\geq 1:32$ wurden gegen PEV1, PEV5, PEV7, PEV9 und gegen DS1734 erhalten (Tabelle 2, S.33).

Neutralisationstiter von 1:8 wurden gegen Coxsackie B4 und von 1:2.048 gegen Coxsackie A9,16 und B5 ermittelt.

Gegen die untersuchten Isolate LCR4 und CBV-D konnten mit den SVDV-Seren keine Kreuzneutralisationstiter ermittelt werden.

4.4. Untersuchung von Schweinefeldseren

Tabelle 5 (S.42) zeigt das Ergebnis einiger Schweinefeldseren im Serumneutralisationstest gegen zwei SVDV-Isolate sowie gegen Coxsackie B5, A9 und A16.

In den Feldseren Nr. 1638 und Nr. 3939 konnten keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden.

Eine positive Reaktion gegenüber den SVDV-Isolaten zeigten die Seren 1640, 1641, 1642, 2581, 2579, 3230, 4498, 3940, 3942 und 3949, wobei die einzelnen Seren unterschiedliche Antikörpertiter gegen die beiden untersuchten SVDV-Isolate aufwiesen. Mit dem Serum 3230 wurden dabei Titer von 1:1024 gegen SVD 6629, aber Titer von $\leq 1:2$ gegen SVD UKG 72/27 festgestellt.

Antikörpertiter von 1:8 lediglich gegen Coxsackie A9 zeigten die Seren Nr. 3267 und Nr. 3269, ohne daß Titer gegen SVDV nachweisbar waren. Reaktionen mit Coxsackie B5 und SVDV traten bei den Seren 2581, 3230 und 3940 auf; letzteres reagierte zudem mit Coxsackie A9 und A16. Serum 1642 reagierte mit SVD 6629, Coxsackie A9 und A16.

Tab. 5 Untersuchung von Schweinefeldseren auf Antikörper gegen
SVDV-Isolate und einige Coxsackie-Stämme

	SVD UKG 72/27	SVD 6629	Coxs B5	Coxs A9	Coxs A16
Serum 1638	<2	<2	<2	<2	<2
Serum 1640	4	32	<2	<2	<2
Serum 1641	<2	8	<2	<2	<2
Serum 1642	<2	16	<2	16	8
Serum 2581	32	32	8	<2	<2
Serum 2579	4	32	<2	<2	<2
Serum 3230	<2	1024	8	<2	<2
Serum 4498	4	16	<2	<2	<2
Serum 3940	<2	4	8	32	8
Serum 3939	<2	<2	<2	<2	<2
Serum 3942	4	8	<2	<2	<2
Serum 3267	<2	<2	<2	8	<2
Serum 3269	<2	<2	<2	8	<2

4.5. Nachweis viraler Proteine mit spezifischen Antiseren sowie deren Kreuzreaktivität in der Radioimmunpräzipitation und im Western Blot

Die Ergebnisse verschiedener Radioimmunpräzipitationen und Western Blot-Analysen werden für die einzelnen Virusisolate in Montagen zusammengefaßt (siehe S.52-77). Diese Zusammenstellungen beinhalten unterschiedliche Läufe mit abweichenden Laufstrecken. Die Marker werden jeweils für den ersten Block angegeben und deren Positionen für die weiteren Blöcke lediglich markiert (-). Bei der Verwendung abweichender Marker sind diese mit den entsprechenden K-Werten versehen.

Die Position der nachweisbaren viralen Proteine wird insbesondere bei sehr schwachen Reaktionen mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Markiert werden auch Radioimmunpräzipitationen, die teilweise nur auf dem exponierten Film deutlich dokumentiert sind.

Die Molekulargewichte der viralen Proteine werden als nach den vorliegenden Elektrophoresebedingungen errechnete Molekulargewichte wiedergegeben und sind von der Größe und Ladung der jeweiligen Proteine abhängig. Da sich die Molekulargewichte für jeden Lauf in Bezug zur Position der zugehörigen Marker errechnen, können geringgradig abweichende Molekulargewichte errechnet werden. Diese werden dann in Klammern () angegeben.

4.5.1. Porzine Enterovirusstämme

PEV1 (s. Abb. 1, S.53)

Bei der Radioimmunpräzipitation wurden das 33.5(34)K- und das 36K-Protein sowohl mit nicht dissoziiertem als auch mit dissoziiertem Antigen erkannt. Bei nicht dissoziiertem Antigen wurde weiterhin ein 31K-, ein 41K-, und ein ca 8K-Protein nachgewiesen. Die Antiseren gegen SVD 6629 und SVD BFA reagierten mit dem 36K- und dem 41K-Protein. Von dem Antiserum SVD UKG 72/27 wurde noch ein weiteres Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 34K erkannt. Alle SVDV-Seren erkannten auch ein ca. 8K-Protein. Die Reaktion mit den SVDV-Seren war nur schwach ausgeprägt.

Im Western Blot wurde vom homologen Serum das 35.5(36)K-Protein erkannt.

PEV2 (s. Abb. 2, S.53)

In der Radioimmunpräzipitation gelang mit homologem Antiserum bei nicht dissoziiertem und dissoziiertem Antigen der Nachweis eines 34K- und 38K-Proteins. Mit nicht dissoziiertem Antigen wurde zusätzlich noch ein 32K- und ein 8K-Protein erkannt. Das Antiserum SVD UKG 72/27 reagierte mit dem 8K-, 32K-, 34K- und dem 38K-Protein, die Antiseren von SVD 6629 und SVD BFA mit dem 8K-, 32K- und 34K-Protein. Die Antigene von dissoziierten Partikeln wurden von allen Seren nur schwach erkannt.

Im Western Blot wurde mit dem homologen Serum das 34K-Protein erkannt.

PEV3 (s. Abb. 3, S.55)

In der Radioimmunpräzipitation wurden mit dem homologen Antiserum sowohl mit nicht dissoziiertem als auch mit dissoziiertem Antigen, hier jedoch schwach, ein 33K-, ein 36K- und ein 40.5K-Protein erkannt. Das SVD BFA-Antiserum reagierte mit einem 35K- und einem 39.5K-Protein, die Seren gegen SVD UKG 72/27 und SVD 6629 zusätzlich noch mit dem 8K-Protein. Mit Ausnahme des SVD UKG 72/27-Serums waren die Reaktionen schwach.

Die homologe Reaktion im Western Blot zeigte eine Reaktion mit einem 32K-, einem 36K- sowie eine schwache Reaktion mit einem 40.5K-Protein.

PEV4 (s. Abb. 4, S.55)

In der Radioimmunpräzipitation wurden von dem homologen Antiserum mit dissoziiertem und nicht dissoziiertem Antigen sowie im Western Blot ein 34(32.5)K-, ein 40(39)K- und ein 43(42)K-Protein erkannt. Zusätzlich war mit nicht dissoziiertem Antigen eine Reaktion mit einem 8K-Protein zu verzeichnen.

Eine Kreuzreaktion fand mit den Antiseren gegen SVD UKG 72/27 und SVD 6629 und den Proteinen 39K (schwache Reaktion) und 8K statt.

PEV5 (s. Abb. 5, S.57)

Die Radioimmunpräzipitation mit homologem Antiserum und nicht dissoziiertem Antigen ergab Proteine von 44.5K, 36.5K, 34K und 8K. Mit dissoziiertem Antigen wurde ein 34K- schwach und ein 36.5K-Protein gut erkannt. Im Western Blot fand eine Reaktion mit einem 38K-Protein statt.

Von den SVDV-Antiseren wurden die Proteine 34(37.5)K schwach erkannt.

Mit SVD UKG 72/27- und SVD 6629-Antiserum trat eine zusätzliche Reaktion mit einem 8K-Protein auf.

PEV6 (s. Abb. 6, S.57)

In der Radioimmunpräzipitation wurden von dem homologen Antiserum mit nicht dissoziiertem Antigen die Proteine 38K, 36K, 35.5K, 30.5K und 8K erkannt, mit dissoziiertem Antigen dagegen nur ein 35K-, 30K- und 8K-Protein. Das Antiserum SVD UKG 72/27 reagierte mit einem 37K-, 34.5K- und 8K-Protein, das SVD 6629-Antiserum dagegen nur mit einem 8K-Protein. Die Reaktion mit dem dissoziierten Antigen war nur sehr schwach.

Im Western Blot fand eine schwache homologe Reaktion mit einem 35.5K- und 31K-Protein statt.

PEV7 (s. Abb. 7, S.59)

Die Radioimmunpräzipitation mit dem homologen Serum und nicht dissoziiertem Antigen führte zum Nachweis schwach erkennbarer 38K- und 36K-Proteinbanden sowie deutlich präzipitierter 35.5K- und 31K-Proteine. Mit dissoziiertem Antigen reagierte nur ein 34.5K-Protein. Die homologe Reaktion im Western Blot zeigte ein 35K- und andeutungsweise ein 36K-Protein.

Die Antiseren von SVD UKG 72/27 und SVD 6629 erkannten das 8K-Protein und SVD UKG 72/27-Antiserum zusätzlich das 34.5K-Protein. Dissoziierte Antigene ergaben nur eine schwache Reaktion.

PEV8 (s. Abb. 8, S.59)

In der Radioimmunpräzipitation reagierten mit dem homologen Antiserum und nicht dissoziiertem sowie dissoziiertem Antigen Proteine mit Molekulargewicht 35.5(34/36)K stark, mit Molekulargewicht 30.5(31)K und 8K schwach. Mit nicht dissoziiertem Antigen wurden zusätzlich die Proteine 26K und 26.5K erkannt. Antiserum SVD UKG 72/27 reagierte mit einem 31K-, einem 33.5K- und einem 35.5K-Protein, Antiserum SVD 6629 erkannte das 33.5K- und das 35.5K-Protein, Antiserum SVD BFA hingegen nur das 33.5K-Protein. Die Reaktion mit den SVDV-Antiseren war lediglich mit dem 8K- und 33.5K-Protein deutlich ausgeprägt.

Die homologe Reaktion im Western Blot erkannte Proteine der Molekulargewichte 34(36)K, während mit SVDV-Antiserum ein 30.5K und ein 32K-Protein nachgewiesen wurden.

PEV9 (s. Abb. 9, S.61)

In der Radioimmunpräzipitation wurden in der homologen Reaktion sowohl bei nicht dissoziiertem, als auch bei dissoziiertem Antigen 36(37)K-, 28.5(27.5)K- und 8K-Proteine erkannt. Mit nicht dissoziiertem Antigen wurde zusätzlich noch ein 30K-Protein gefällt. Die SVDV-Antiseren erkannten ein 36K-, 31K-, und ein 8K-Protein. Mit dissoziiertem Antigen wurde lediglich das 36K-Protein mit dem homologen Antiserum gut erkannt.

Im Western Blot wurde mit dem homologen Antiserum ein 37(38)K-Protein nachgewiesen.

PEV10 (s. Abb. 10, S.61)

Das homologe Antiserum ergab in der Radioimmunpräzipitation sowohl mit nicht dissoziiertem als auch mit dissoziiertem Antigen deutliche Banden mit den Proteinen 37.5(38)K- und 27(26)K. Weiterhin wurden mit nicht dissoziiertem Antigen die Proteine 31K und 28K, mit dissoziiertem Antigen das Protein 8K gefällt. Die Antiseren SVD UKG 72/27 und 6629 erkannten deutlich ein 38K-, und ein 8K-Protein. SVD UKG 72/27 fällt zudem ein 31K- und ein 28K-Protein.

Im Western Blot wurde sowohl homolog als auch von dem SVDV-Antiserum, hier jedoch nur schwach, ein 38(39)K-Protein erkannt.

PEV11 (s. Abb. 11, S.63)

In der Radioimmunpräzipitation wurden mit dem homologen Antiserum und nicht dissoziiertem Antigen Proteine folgender Molekulargewichte gefällt: 39K, 37K, 34.5K, 32.5K, 27(28)K und 8K. Das 37K-Protein wurde auch bei dissoziiertem Antigen erkannt. Die Antiseren von SVD UKG 72/27 und 6629 reagierten mit dem 8K-Protein.

DS1734 (s. Abb. 12, S.63)

Die Radioimmunpräzipitation mit dem homologen Antiserum und nicht dissoziiertem Antigen verursachte eine Fällung von Proteinen folgender Molekulargewichte: 39K, 36K, 34K, 30K, 8K. Bei dissoziiertem Antigen wurde das 34K-Protein erkannt. Mit den Antiseren SVD UKG 72/27 und 6629 wurde nur das 8K-Protein nachgewiesen.

Im Western Blot reagierte ein 34(35)K-Protein mit dem homologen Antiserum.

4.5.2. Bovine Enterovirusstämme

LCR4 und CBV-D (s. Abb. 13, S.65)

In der Radioimmunpräzipitation wurden mit dem homologen Antiserum und nicht dissoziierten Viruspartikeln bei beiden untersuchten Isolaten Proteine der Molekulargewichte 39K, 37K, 30.5K und 27.5K gefällt.

4.5.3. Humane Enterovirusstämme

Coxsackie B1 (s. Abb. 14, S.65)

In der Radioimmunpräzipitation wurden mit dem Coxsackie B1-Antiserum Proteine mit einem Molekulargewicht von 46(47K), 39K, 34K und 30K sowohl mit dissoziiertem als auch mit nicht dissoziiertem Antigen nachgewiesen, wobei das 34K-Protein aus dissoziierten Partikeln deutlich immunpräzipitierte. Das 8K-Protein war nur mit nicht dissoziierten Viruspartikeln nachweisbar.

47K-, 39K-, 34K- und 30.5K-Proteine reagierten mit SVD UKG 72/27. SVD 6629 erkannte das 39K-, 34K- und schwach das 30.5K-Protein, während SVD BFA nur mit dem 39K- und dem 34K-Protein reagierte.

Im Western Blot waren mit dem homologen Serum ein 34K- und 31.5K-Protein spezifisch anfärbbar.

Coxsackie B2 (s. Abb. 15, S.67)

Die Radioimmunpräzipitation mit dem homologen Antiserum führte zum Nachweis der Proteine 30.5K, 33(34K), 38(39K) mit dissoziierten und nicht dissoziierten Viruspartikeln. Ein 8K-Protein reagierte nur mit nicht dissoziierten Partikeln.

Alle vier Proteine wurden von SVD UKG 72/27-Antiserum erkannt, SVD 6629-Antiserum fällte das 30.5K-, 33K- und das 38K-Protein, SVD BFA-Antiserum zeigte eine schwache Kreuzreaktion mit dem 33K- und 38K-Protein.

Im Western Blot wurden mit dem homologen Antiserum und dem SVDV-Antiserum Proteine mit Molekulargewichten von 33K und 39K erkannt, wobei das 39K-Protein mit dem homologen Antiserum stärker nachweisbar war.

Coxsackie B3 (s. Abb. 16, S.67)

In der Radioimmunpräzipitation wurden von dem homologen Antiserum die Proteine der Molekulargewichte 33.5(34)K, 37(39)K, 46K bei nicht dissoziiertem und dissoziiertem Antigen nachgewiesen, das 27K-Protein hingegen wurde nur in nicht dissoziierter Form erkannt.

SVD UKG 72/27-Antiserum fällte das 34K-, 37K- und das 46K-Protein, das SVD 6629-Antiserum das 34K- und das 38K-Protein, während das SVD BFA-Antiserum keine Reaktion mit Coxs B3 zeigte.

Im Western Blot wurde mit dem homologen Serum ein 34K-Protein erkannt.

Coxsackie B5 (s. Abb. 17, S.69)

Von den spezifischen viralen Strukturproteinen wurden mit dem homologen Antiserum bei dissoziiertem und nicht dissoziiertem Antigen in der Radioimmunpräzipitation Proteine des errechneten Molekulargewichts 29(29.5)K, 33.5(32.5)K, 38K gefällt. Mit nicht dissoziiertem Antigen konnte zusätzlich noch eine Reaktion mit einem 8K-Protein erhalten werden.

Alle vier Proteine wurden sowohl von SVD UKG 72/27-Antiserum, als auch von SVD 6629-Antiserum erkannt, während mit SVD BFA-Antiserum nur eine Reaktion mit dem 8K- und 32.5K-Protein stattfand.

Der Western Blot führte mit dem homologen Antiserum sowie mit dem SVDV-Antiserum zum Nachweis von 31K- und 34K-Proteinen. Ein 39K-Protein reagierte nur schwach mit dem homologen Antiserum.

Coxsackie B6 (s. Abb. 18, S.69)

Coxsackie B6-Antiserum reagierte in der Radioimmunpräzipitation spezifisch mit den Proteinen 8K, 30.5K, 33K, 35K und 40K. Diese Proteine traten sowohl bei dissoziierten als auch bei nicht dissoziierten Viruspartikeln auf.

Die Proteine wurden auch von den Antiseren gegen SVD UKG 72/27 und SVD 6629 erkannt, während das SVD BFA-Antiserum ein 36K-Protein nur schwach fällte.

Der Nachweis dieser Proteine, mit Ausnahme des 8K-Proteins, gelang mit dem homologen Serum auch im Western Blot. Das SVDV-Antiserum reagierte mit dem 30.5K- und dem 36K-Protein.

Coxsackie A9 (s. Abb. 19, S.71)

In der Radioimmunpräzipitation erkannte das homologe Antiserum ein 31K-, 34.5(34)K-, 40(41)K- und ein 47K-Protein sowohl bei nicht dissoziiertem als auch bei dissoziiertem Antigen. Mit nicht dissoziiertem Antigen wurde zusätzlich noch ein 8K-Protein gefällt.

Die Antiseren gegen SVD UKG 72/27 und SVD 6629 reagierten mit den Proteinen 31K, 34K, 40K und 47K, mit dem SVD BFA-Antiserum erfolgte lediglich eine Reaktion mit dem 34K-Protein.

Im Western Blot gelang mit dem homologen Antiserum der Nachweis von 30K-, 34K- (schwach) und 35K-Proteinen. Das SVDV-Antiserum erkannte deutlich das 35K-Protein und schwächer ein 30K- und 41K-Protein.

Coxsackie A16 (s. Abb. 20, S.71)

Homologes Antiserum fällte in der Radioimmunpräzipitation 30(30.5)K-, 34(33)K- und 40(38)K-Proteine bei nicht dissoziiertem Antigen. Mit dissoziiertem Antigen wurde das 40K-Protein nur schwach immunpräzipitiert. Diese Proteine reagierten in gleicher Weise auch mit den beiden Antiseren gegen SVD UKG 72/27 und SVD 6629, während SVD BFA-Antiserum nur das 34K-Protein erkannte.

Ein 32K- und 35K-Protein war im Western Blot mit dem homologen Antigen nachweisbar. Das Antiserum gegen SVDV zeigte eine deutliche Reaktion gegenüber dem 35K-Protein und schwächere Anfärbung eines 32K- und 41K-Proteins.

4.5.4. SVDV-Isolate

SVD UKG 72/27

In der Radioimmunpräzipitation mit nicht dissoziiertem Antigen (s. Abb. 21, S.73) wurden von dem homologen Immuserum 30K-, 33K- und 38K-Proteine nachgewiesen. Diese Proteine traten auch bei den Kreuzreaktionen mit den Antiseren SVD BFA, PEV2, PEV5, PEV7, PEV9, PEV11, Coxs A9, Coxs B5 und einem Schweine-Feldserum auf.

Die Radioimmunpräzipitation mit dissoziiertem Antigen (s. Abb. 22, S.73) führte mit dem homologen Antiserum zum Nachweis von Proteinen mit einem errechneten Molekulargewicht von 8K, 29.5K, 31K, 33.5K, 35K und 36K.

Kreuzreaktionen traten mit folgenden Antiseren auf: PEV2-Antiserum mit dem 35K- und 33.5K-Protein, PEV4-Antiserum mit dem 35K-Protein, PEV6 mit dem 8K-Protein, PEV9 mit dem 35K- und 8K-Protein und PEV11 mit dem 36K- und 29.5K-Protein. Die Immunpräzipitationen mit den PEV-Antiseren waren nur sehr schwach ausgeprägt. Die Antiseren von Cocksackie B1 (schwach), B2 und B3 erkannten das 33.5K-Protein, Cocksackie B4-Antiserum reagierte mit dem 35K-, 33.5K- und 31K-Protein, neben diesen wurde von Cocksackie B5-Antiserum noch das 36K-Protein erkannt. Cocksackie B6-Antiserum erkannte die Proteine 35K und 33.5K, während die Antiseren gegen Cocksackie A9 und A16 die Proteine 35K, 33.5K und 31K fällten.

SVD 6629

Das homologe Antiserum immunpräzipitierte fünf Proteine des dissoziierten Antigens mit Molekulargewichten von 8K, 29.5K, 31K, 35.5K und 36.5K (s. Abb. 23, S.75). Während die Antiseren von Cocksackie B4, B5, B6, A9, A16 das 35.5K- und das 31K-Protein erkannten, reagierten die Antiseren gegen Cocksackie B2 und B3 nur mit dem 35.5K-Protein. Die Fällung der Proteine mit den Cocksackie B2-, B3- und B4-Antiseren war schwächer als die mit den Cocksackie B5-, A9- und A16-Antiseren, wobei letzteres das 31K-Protein schwächer erkannte als das 35.5K-Protein.

Im Western Blot (s. Abb. 24, S.75) konnten sowohl durch das homologe als auch durch das SVD UKG 72/27-Antiserum 30.5K-, 36K- und 39K-Proteine nachgewiesen werden. Das SVD BFA-Antiserum erkannte lediglich die Proteine 30.5K und 36K. Die Antiseren von PEV3, PEV4 und PEV7, Cocksackie B1, B2 und B3 reagierten mit dem 36(35)K- und dem 30(30.5)K-Protein, wobei das 36(35)K-Protein mit anti-Cocksackie B2- und -B3-Seren eine starke Reaktion ergab. Cocksackie B4-Antiserum erkannte ein 36(34)K-Protein, Antiserum Cocksackie B5 ein 36(34)K-Protein und ein 30(28)K-Protein, Antiserum Cocksackie A9 ein 36K-Protein und ein 30(28)K-Protein, Antiserum Cocksackie A16 ein 36(34)K-Protein.

Abb. 11: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel (A) und dissoziierter Viruspartikel (B) aus Lysat ^{35}S -markierter PS-EK-Zellen (A, Spur 1), 12 Stunden nach Infektion mit PEV11. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 2: Kaninchen anti-PEV11-Serum

Spuren 3: Präimmunserum

Spuren 4: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

Spur 5: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spur 6: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum.

Abb. 12: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel aus Lysat ^{35}S -markierter PS-EK-Zellen (A, Spur 1), 9 Stunden nach Infektion mit ECB0-Isolaten LCR4 (A) und CBV-D (A').

Spuren 2: Kaninchen anti-LCR4-Serum (A)

Kaninchen anti CBV-D-Serum (A')

Spuren 3: Präimmunserum.

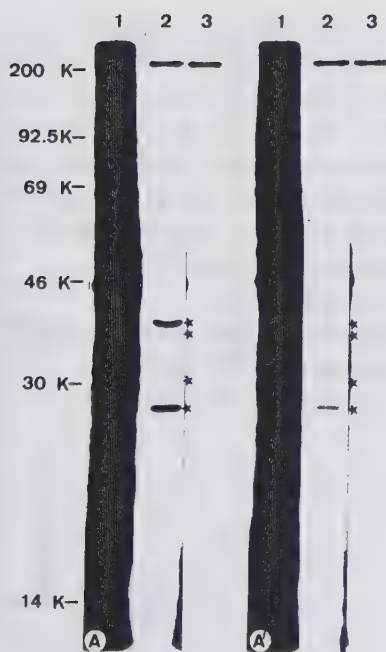
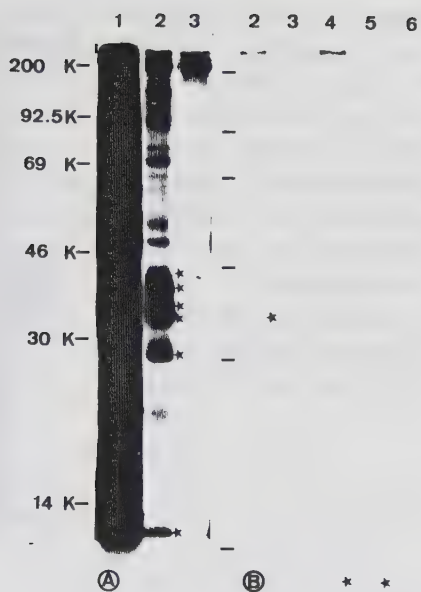


Abb. 13: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel (A) und dissoziierter Viruspartikel (B) aus Lysat ^{35}S -markierter PS-EK-Zellen (A, Spur 1), 12 Stunden nach Infektion mit DS1734 sowie durch Western Blot (C) mittels gereinigter Viruspartikel. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 2: Kaninchen anti-DS1734-Serum

Spuren 3: Präimmunserum

Spuren 4: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

Spur 5: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spur 6: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum.

Abb. 14: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel (A) und dissoziierter Viruspartikel (B) aus Lysat ^{35}S -markierter HeLa-Zellen (A, Spur 1), 12 Stunden nach Infektion mit Coxs B1 sowie durch Western Blot (C) mittels gereinigter Viruspartikel. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 2: Kaninchen anti-Coxs B1-Serum

Spuren 3: Präimmunserum

Spuren 4: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

Spur 5: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spur 6: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum.

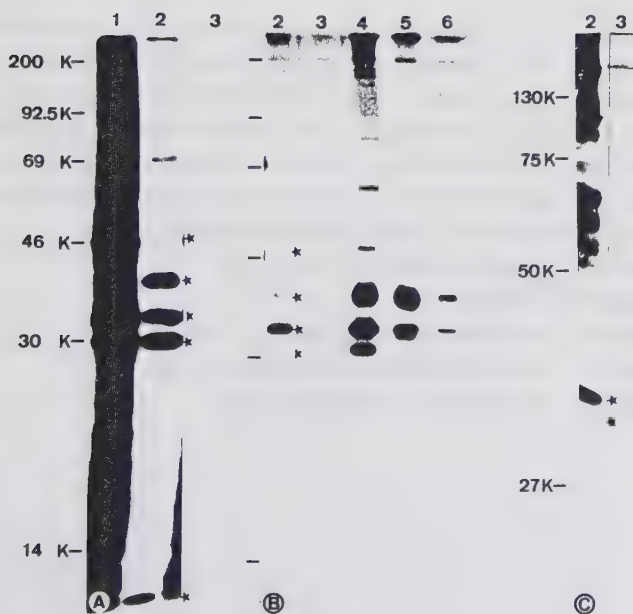
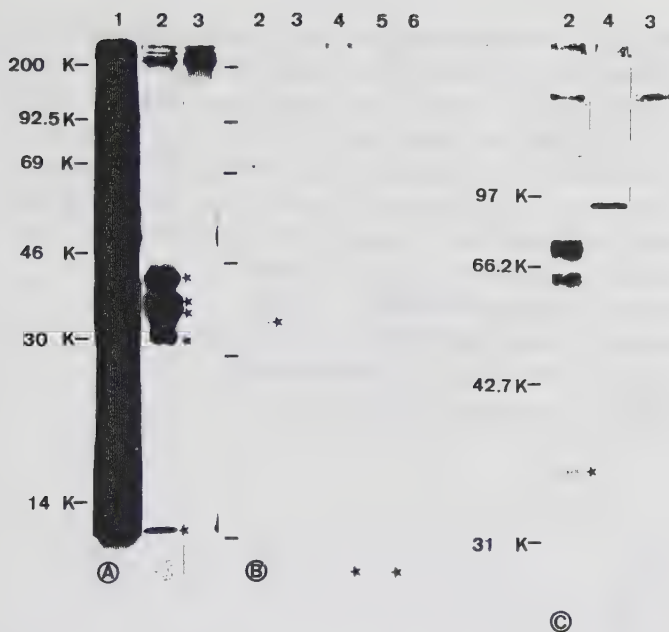


Abb. 15: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel (A) und dissoziierter Viruspartikel (B) aus Lysat ^{35}S -markierter HeLa-Zellen (A, Spur 1), 24 Stunden nach Infektion mit Coxs B2 sowie durch Western Blot (C) mittels gereinigter Viruspartikel. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 2: Kaninchen anti-Coxs B2-Serum

Spuren 3: Präimmunserum

Spuren 4: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

Spur 5: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spur 6: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum.

Abb. 16: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel (A) und dissoziierter Viruspartikel (B) aus Lysat ^{35}S -markierter HeLa-Zellen (A, Spur 1), 36 Stunden nach Infektion mit Coxs B3 sowie durch Western Blot (C) mittels gereinigter Viruspartikel. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 2: Kaninchen anti-Coxs B3-Serum

Spuren 3: Präimmunserum

Spuren 4: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

Spur 5: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spur 6: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum.

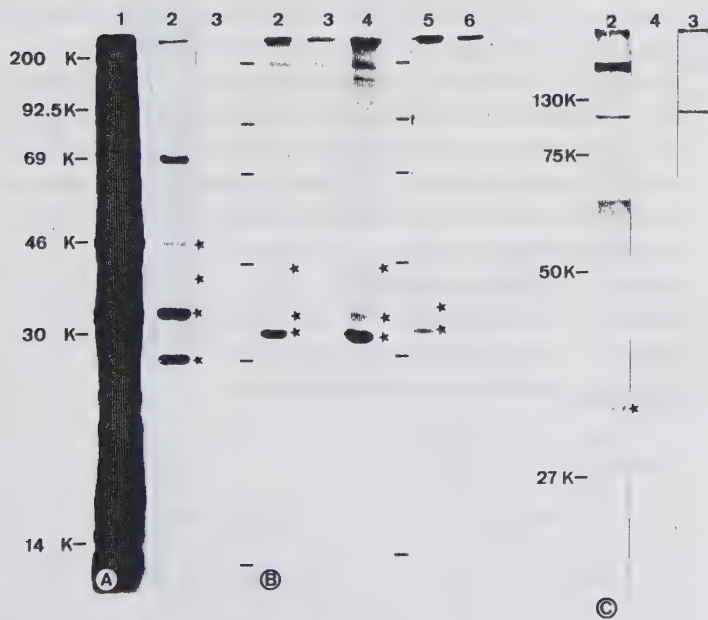
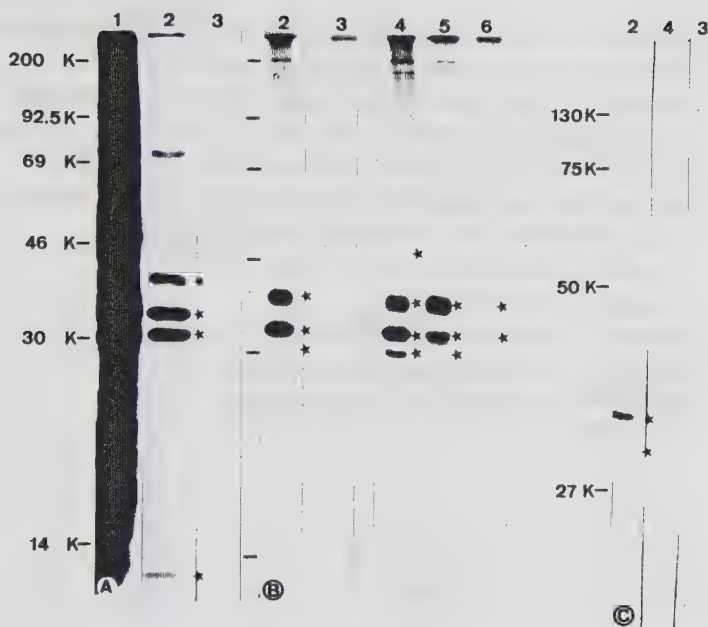


Abb. 17: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel (A) und dissoziierter Viruspartikel (B) aus Lysat ^{35}S -markierter PS-EK-Zellen (A, Spur 1), 9 Stunden nach Infektion mit Coxs B5 sowie durch Western Blot (C) mittels gereinigter Viruspartikel. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 2: Kaninchen anti-Coxs B5-Serum

Spuren 3: Präimmunserum

Spuren 4: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

Spur 5: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spur 6: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum.

Abb. 18: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel (A) und dissoziierter Viruspartikel (B) aus Lysat ^{35}S -markierter HeLa-Zellen (A, Spur 1), 12 Stunden nach Infektion mit Coxs B6 sowie durch Western Blot (C) mittels gereinigter Viruspartikel. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 2: Kaninchen anti-Coxs B6-Serum

Spuren 3: Präimmunserum

Spuren 4: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

Spur 5: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spur 6: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum.

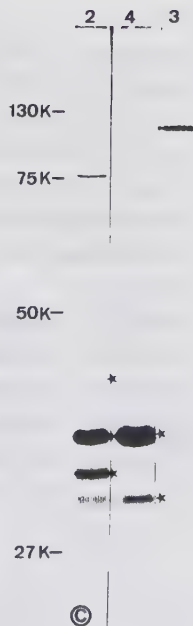
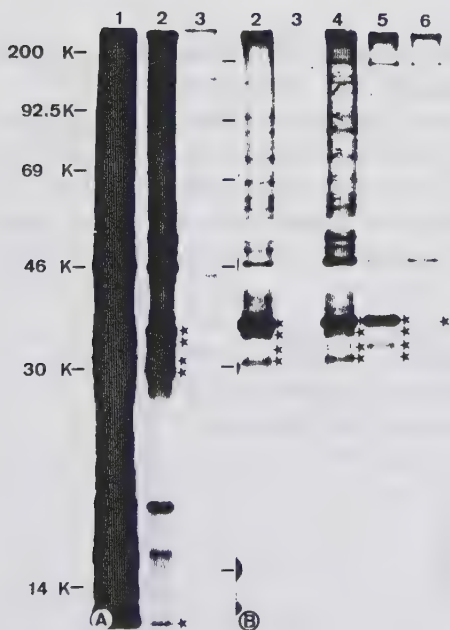
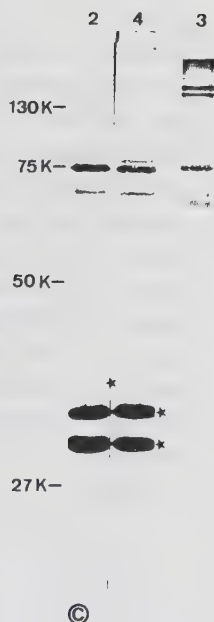
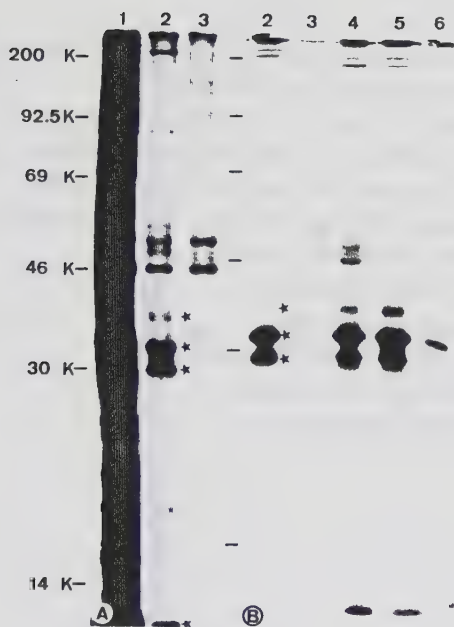


Abb. 19: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel (A) und dissoziierter Viruspartikel (B) aus Lysat ^{35}S -markierter HeLa-Zellen (A, Spur 1), 24 Stunden nach Infektion mit Coxs A9 sowie durch Western Blot (C) mittels gereinigter Viruspartikel. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 2: Kaninchen anti-Coxs A9-Serum

Spuren 3: Präimmunserum

Spuren 4: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

Spur 5: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spur 6: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum.

Abb. 20: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel (A) und dissoziierter Viruspartikel (B) aus Lysat ^{35}S -markierter HeLa-Zellen (A, Spur 1), 24 Stunden nach Infektion mit Coxs A16 sowie durch Western Blot (C) mittels gereinigter Viruspartikel. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 2: Kaninchen anti-Coxs A16-Serum

Spuren 3: Präimmunserum

Spuren 4: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

Spur 5: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spur 6: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum.

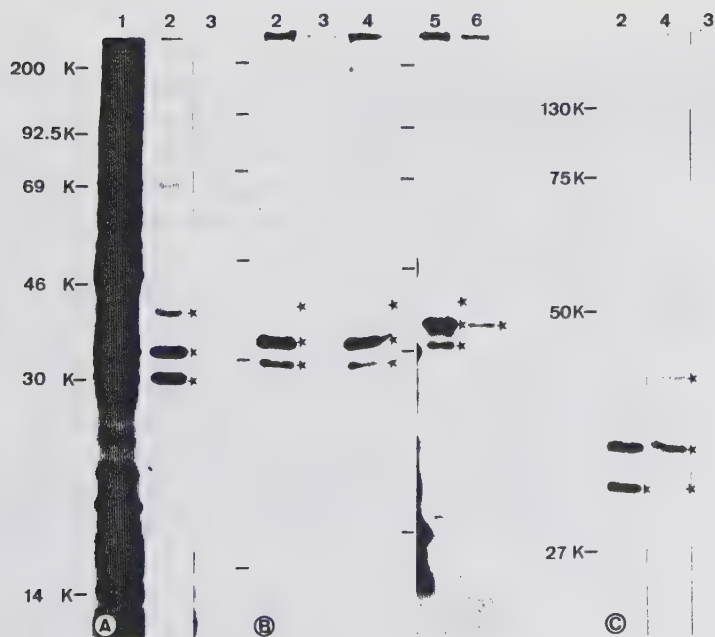
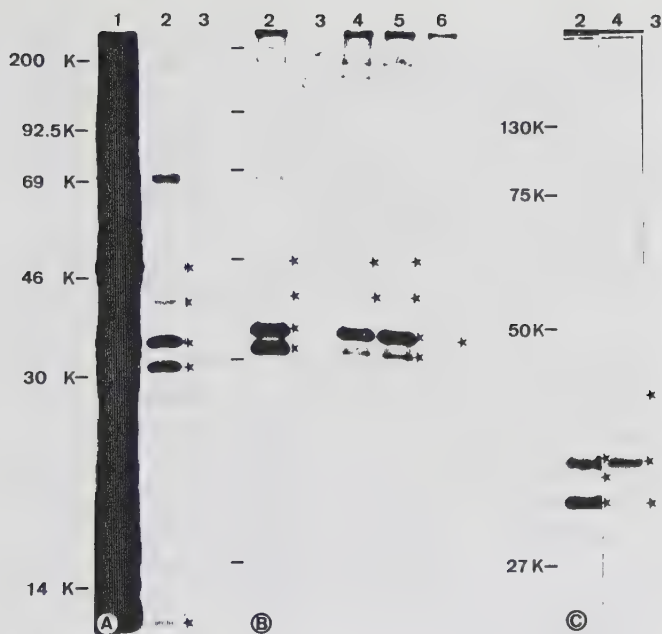


Abb. 21: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation nicht dissoziierter Viruspartikel aus Lysat ^{35}S -markierter PS-EK-Zellen (Spur 20), 9 Stunden nach Infektion mit SVD UKG 72/27. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spur 1 zeigt nichtinfizierte markierte PS-EK-Zellen radioimmunpräzipitiert mit dem Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum.

Die Spuren 2-19 zeigen infizierte Zellen nach

Radioimmunpräzipitation mit folgenden Seren: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27- (2), Kaninchen anti-PS-EK- (3), anti-SVD BFA- (4), anti-PEV1- (5), anti-PEV2- (6), anti-PEV3- (7), anti-PEV4- (8), anti-PEV5- (9), anti-PEV6- (10), anti-PEV7- (11), anti-PEV8- (12), anti-PEV9- (13), anti-PEV10- (14), anti-PEV11- (15), anti-DS1734- (16), anti-Coxs A9- (17), anti-Coxs B5-Serum (18) sowie Schweine anti-SVDV-Feldserum (19).

Abb. 22: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation dissoziierter Viruspartikel aus Lysat ^{35}S -markierter PS-EK-Zellen, 9 Stunden nach Infektion mit SVD UKG 72/27. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren (Spuren 1-24):

Kaninchen anti-SVD UKG 72/27- (1), anti-PS-EK- (2), anti-PEV1- (3), anti-PEV2- (4), anti-PEV3- (5), anti-PEV4- (6), anti-PEV5- (7), anti-PEV6- (8), anti-PEV7- (9), anti-PEV8- (10), anti-PEV9- (11), anti-PEV10- (12), anti-PEV11- (13), anti-LCR4- (14), anti-CBV-D- (15), anti-Coxs B1- (16), anti-Coxs B2- (17), anti-Coxs B3- (18), anti-Coxs B4- (19), anti-Coxs B5- (20), anti-Coxs B6- (21), anti-Coxs A9- (22), anti-Coxs A16- (23) und anti-ECH07-Serum (24).

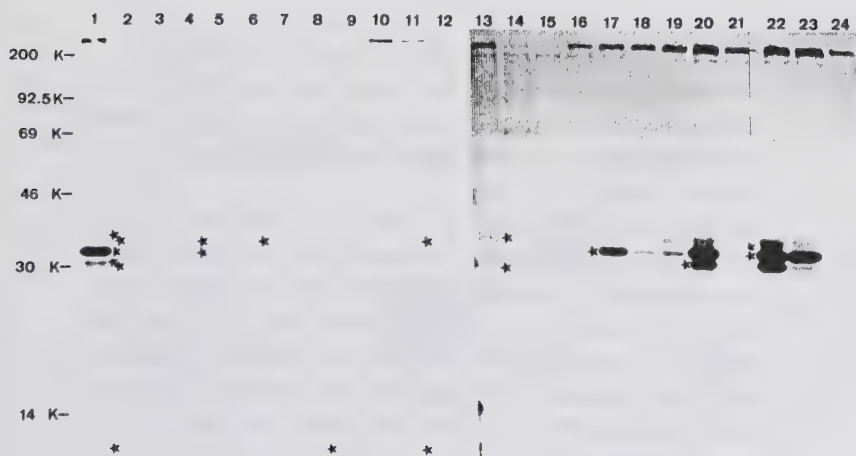
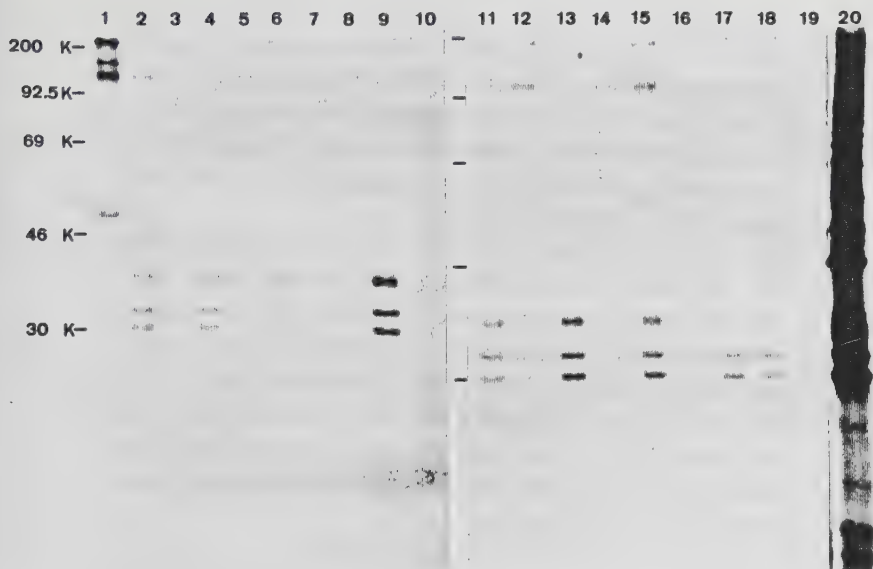


Abb. 23: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation dissoziierter Viruspartikel aus Lysat ^{35}S -markierter PS-EK-Zellen, 9 Stunden nach Infektion mit SVD 6629. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren (Spuren 1-25):

Kaninchen anti-SVD UKG 6629- (1), anti-PS-EK- (2), anti-PEV1- (3), anti-PEV2- (4), anti-PEV3- (5), anti-PEV4- (6), anti-PEV5- (7), anti-PEV6- (8), anti-PEV7- (9), anti-PEV8- (10), anti-PEV9- (11), anti-DS1734- (12), anti-PEV10- (13), anti-PEV11- (14), anti-LCR4- (15), anti-CBV-D- (16), anti-Coxs B1- (17), anti-Coxs B2- (18), anti-Coxs B3- (19), anti-Coxs B4- (20), anti-Coxs B5- (21), anti-Coxs B6- (22), anti-Coxs A9- (23), anti-Coxs A16- (24) und anti-ECH07-Serum (25).

Abb. 24: Nachweis viraler Antigene durch Western Blot mittels gereinigter Viruspartikel des Isolats SVD 6629. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren (Spuren 1-22):

Kaninchen anti-PEV1- (1), anti-PEV2- (2), anti-PEV3- (3), anti-PEV4- (4), anti-PEV5- (5), anti-PEV6- (6), anti-PEV7- (7), anti-PEV8- (8), anti-PEV10- (9), anti-SVD 6629- (10), anti-SVD UKG 72/27- (11), anti-SVD BFA- (12), anti-Coxs B1- (13), anti-Coxs B2- (14), anti-Coxs B3- (15), anti-DS1734- (16), anti-Coxs B4- (17), anti-Coxs B5- (18), anti-Coxs B6- (19), anti-Coxs A9- (20), anti-Coxs A16- (21) und anti-ECH07-Serum (22).



Abb. 25: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation dissoziierter Viruspartikel aus Lysat ^{35}S -markierter PS-EK-Zellen, 9 Stunden nach Infektion mit SVD BFA. Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren (Spuren 1-25):

Kaninchen anti-SVD BFA- (1), anti-PS-EK- (2), anti-PEV1- (3), anti-PEV2- (4), anti-PEV3- (5), anti-PEV4- (6), anti-PEV5- (7), anti-PEV6- (8), anti-PEV7- (9), anti-PEV8- (10), anti-PEV9- (11), anti-PEV10- (12), [†]anti-PEV11- (13), anti-DS1734- (14), anti-LCR4- (15), anti-CBV-D- (16), anti-Coxs B1- (17), anti-Coxs B2- (18), anti-Coxs B3- (19), anti-Coxs B4- (20), anti-Coxs B5- (21), anti-Coxs B6- (22), anti-Coxs A9- (23), anti-Coxs A16- (24) und anti-ECH07-Serum (25).

Abb. 26: Nachweis viraler Antigene durch Radioimmunpräzipitation dissoziierter Viruspartikel aus Lysat (Spuren 1,2,3) ^{35}S -markierter PS-EK-Zellen Stunden, 9 nach Infektion mit SVD UKG 72/27 (Spuren 1,4,7,8,9,10), SVD 6629 (Spuren 2,5,11,12, 13,14), oder SVD BFA (Spur 3,6,15,16,17,18). Der Nachweis erfolgte nach Auftrennung in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Seren.

Spuren 4,7: Kaninchen anti-SVD UKG 72/27-Serum

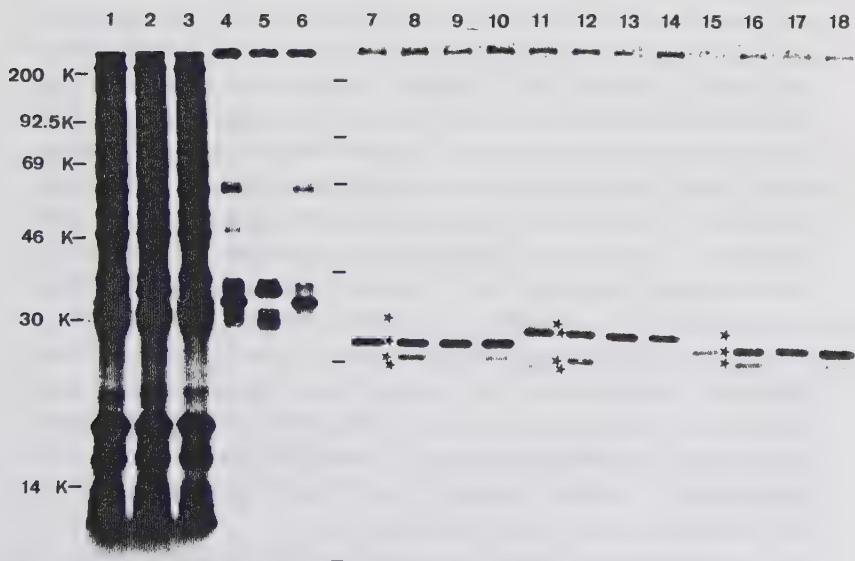
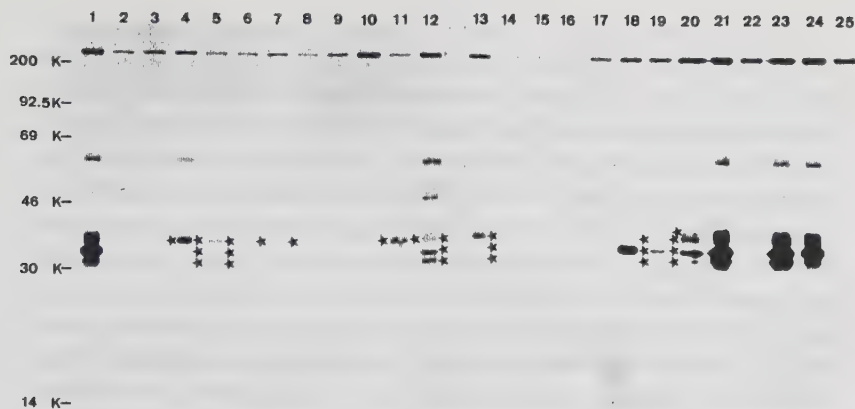
Spuren 5,11: Kaninchen anti-SVD 6629-Serum

Spuren 6,15: Kaninchen anti-SVD BFA-Serum

Spuren 8,12,16: Kaninchen anti-Coxs A9-Serum

Spuren 9,13,17: Kaninchen anti-Coxs A16-Serum

Spuren 10,14,18: Kaninchen anti-Coxs B5-Serum.



5. Diskussion

Ziel der Arbeit war die Ermittlung antigener Verwandtschaften des Virus der Vesikulären Schweinekrankheit (swine vesicular disease, SVD) zu anderen porzinen Enteroviren und ausgewählten Enteroviren bei Mensch und Rind. Die untersuchten Virusstämme wurden dabei auf Kreuzreaktivität im Serumneutralisationstest sowie auf gemeinsame Epitope viraler Strukturproteine im Western Blot und in der Radioimmunpräzipitation getestet.

Die Gewinnung eines hochgereinigten immunogenen Antigens erfolgte durch Dichte zentrifugation der einzelnen Virusstämme über Saccharose-Gradienten. Dabei wiesen die untersuchten Virusstämme spezifische Dichten zwischen 1.369 g/cm^3 und 1.389 g/cm^3 auf. Für Enteroviren sind im CsCl-Gradienten spezifische Dichten zwischen $1,29 \text{ g/cm}^3$ und $1,44 \text{ g/cm}^3$ beschrieben (8,80,83). Betts u. Mitarb. (8) ermittelten für Schweineenteroviren spezifische Dichten im Bereich von $1,33$ - $1,34 \text{ g/cm}^3$. Das Auftreten von zwei Virus-spezifischen Banden unterschiedlicher Dichte steht auch im Einklang mit anderen Enterovirus-Stämmen. In der Gewebekultur vermehrte Polioviren wiesen nach Auftrennung im Saccharose-Gradienten zwei verschiedene Viruskomponenten abweichender Dichte und unterschiedlicher Antigenität auf. Auf Grund der unterschiedlichen Lokalisation im Gradienten bezeichneten sie Mayer u. Mitarb. (65) als C- beziehungsweise D-Antigene. Während die dichtere D-Komponente aus kompletten, infektiösen und nichtinfektiösen Viruspartikeln besteht, enthält das C-Antigen die nukleinsäurefreien Proteinhüllen des Virus. Schmidt u. Mitarb. (83) berichteten von einer Variabilität der Dichten der C-Komponente bei verschiedenen Coxsackie-Serotypen. Die von ihnen ermittelten spezifischen Dichten für Coxsackie B4 und B5 im CsCl-Gradienten lagen bei $1,30 \text{ g/cm}^3$ und für Coxsackie A9 bei $1,29 \text{ g/cm}^3$. Rowlands u. Mitarb. (80) fanden für Poliovirus Serotyp 1, Coxsackie B5, das bovine Enterovirus VG-5-27 und SVDV eine leichte Komponente (C-Komponente) mit $1,34 \text{ g/cm}^3$ und eine schwere Komponente (D-Komponente) mit $1,44 \text{ g/cm}^3$ im CsCl-Gradienten. Die von uns zur Immunisierung verwendeten Antigene zeigten somit bezüglich Dichte und Verhalten im Gradienten typische für andere Enteroviren beschriebene Eigenschaften.

Der serologische Nachweis einer SVDV-Infektion wird im

Serumneutralisationstest geführt. Dabei werden für Feldseren Antikörpertiter $>1:16$ im Mikroneutralisationstest als SVDV-spezifisch bewertet (66). Da Hyperimmunseren unter Zusatz von Freund'schem Adjuvans in der Regel wesentlich höhere Antikörpertiter erreichen als nach natürlicher Infektion von Schweinen, werden derartige Antiseren als spezifisch bezeichnet, wenn die heterologen neutralisierenden Antikörpertiter 5 % des homologen Titors nicht überschreiten (26).

Im Gegensatz zu den restlichen Virusstämmen waren mit Cocksackie B3 und PEV10 trotz dreimaliger Immunisierung keine Seren mit hohen homologen neutralisierenden Antikörpertitern zu gewinnen. Die schwache Induktion neutralisierender Antikörper durch die beiden Virusstämme Cocksackie B3 und PEV10 im Gegensatz zu der deutlichen Reaktion der Seren mit den viralen Strukturproteinen im Western Blot und der Radioimmunpräzipitation ist durch einen Mangel neutralisationsrelevanter Epitope in dem zur Immunisierung verwendeten Material zu erklären. Neutralisationsrelevante Epitope könnten dabei für die Erkennung unzugänglich gewesen sein, weil sie unter den gegebenen Bedingungen nicht ausreichend gut auf der Oberfläche exprimiert waren oder es sich um diskontinuierliche, konformatorische Epitope handelte.

Nach Zweitimmunisierung mit PEV1 und PEV8 fand ein Abfall der neutralisierenden Antikörpertiter statt. Da sich die Haltungs- und Hygienebedingungen während des gesamten Versuchszeitraums nicht änderten, kann eine Verschlechterung derselben für den Antikörpertiterabfall nicht in Frage kommen. Weit wahrscheinlicher sind Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper als Ursache in Betracht zu ziehen.

Sowohl die mangelhafte Induktion bestimmter Antikörper als auch der Abfall von Antikörpertitern nach Sekundärkontakt mit dem Antigen sind als Folge erworbener Toleranzmechanismen beschreiben. Sercarz u. Mitarb. (10,88) fanden dabei eine Korrelation zwischen der Antigendosis und Dauer sowie dem Grad der Toleranz. Weitere Faktoren sind die Bindungsstärke (Avidität) der Antikörper an das Antigen, die Anzahl der Bindungen sowie die Vernetzung der Zellmembran-ständigen Rezeptoren durch polyvalente Antigenmoleküle (72,84,85). Mitchison, N.A., (68) konnte zeigen, daß in adulten Mäusen Toleranz sowohl durch zu wenig als auch durch zuviel Antigen induziert wurde. Weigle (100) bezeichnete dieses Phänomen als Hoch- beziehungsweise Niedrigzonentoleranz ("high-" beziehungsweise "low-zone-tolerance"),

wobei die Niedrigzonentoleranz infolge Ausbleibens der T-Helferzell-Antwort und Hochzonentoleranz durch zusätzliches Fehlen einer B-Zell-Reaktivität bedingt sind. Somit ist die Niedrigzonentoleranz nur mit T-Zell-abhängigen Antigenen möglich. Bei Verwendung viraler Antigene können grundsätzlich beide Arten der Toleranz auftreten. Untersuchungen mit viralem Antigen (90,98) wie dem Rous-Sarkom Virus (81) und dem Lymphozytären Choriomenigitis Virus (42) ergaben, daß hierbei vorwiegend partielle Toleranzen auftraten. Die Antigenerkennung ist weiterhin abhängig von dem Zustand des Antigens. So konnten verschiedene Autoren mit denaturierten Antigenen keine Toleranz erzeugen (2,30,46). Sercarz (persönliche Mitteilung) zeigte am Beispiel des Hühnerlysozyms, daß Antigene eine Vielzahl von T-Helfer- als auch T-Suppressor-Determinanten aufweisen. Je nach konformationsabhängiger Lage und Expression dieser Determinanten werden T-Helferzellen-abhängige Antikörper induziert oder nicht. Frei u. Mitarb. (34,35) fanden, daß agglutinierte Antigene wesentlich bessere Antikörperinduktoren sind als lösliche Antigene. Ihre Untersuchungen ergaben, daß dies auf eine deutlich bessere Phagozytose der agglutinierten Antigene zurückzuführen war.

Während die bisher diskutierten Mechanismen vorwiegend den Erstkontakt mit Antigen betreffen, treten die folgenden Abläufe vorwiegend bei Sekundärkontakten auf und müssen als mögliche Ursache für den Abfall der neutralisierenden Antikörpertiter nach der Zweitimmunisierung mit PEV1 sowie PEV8 in Betracht gezogen werden. Beim Vorliegen spezifischer Antikörper werden nach erneuter Verabreichung von Antigen Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet. In in-vitro Versuchen konnten Feldmann und Diener (22,31) zeigen, daß derartige Komplexe hoch tolerogen sind und erneute Antikörperbildung unterdrücken können. Ein anderer Mechanismus ist durch die Ausbildung anti-idiotypischer Antikörper gegeben. Diese können entweder Klone Idiotyp-produzierender Zellen eliminieren (55,93) oder deren Antikörperfreisetzung unterbinden (36,37,86,87). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß die Aktivierung idiotyp-spezifischer Suppressorzellen als auch das Auftreten auto-anti-idiotypischer Antikörper für eine Herabregulierung der Immunantwort verantwortlich sein können (10,11,32,33).

Die Antiseren gegen PEV8 und PEV10 wiesen eine starke gegenseitige Kreuzreaktion auf, wobei spezifische homologe Titer nicht zu erreichen waren. Diese serologische Verwandtschaft bestätigte sich durch die

Radioimmunpräzipitation. Beide Serotypen zeigten virale Strukturproteine, die sich in ihrem gelelektrophoretischen Laufverhalten nicht unterscheiden. Das verwendete SVDV-Antiserum (anti-SVD UKG 72/27) reagierte im Western Blot mit zwei Strukturproteinen des PEV8-Antigens, aber nur schwach mit einem Strukturprotein des PEV10-Antigens, das unter den vorliegenden Elektrophoresebedingungen eine geringere Laufstrecke aufweist. In der Radioimmunpräzipitation wird einerseits das Strukturprotein des PEV10 mit dem anscheinend höchsten Molekulargewicht und andererseits die beiden viralen Strukturproteine des PEV8 mit den nächst kürzeren Laufstrecken erkannt. Da es sich bei dem SVDV-Antiserum um ein polyklonales Serum handelt, das bei den beiden Serotypen eine unterschiedliche Anzahl viraler Strukturproteine erkennt, dürften hier sich nicht entsprechende antigene Determinanten auf unterschiedlichen Strukturproteinen vorliegen. Diese werden von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität erkannt. Möglicherweise könnten aber die entsprechenden Epitope sowohl bei PEV8 als auch bei PEV10 vorhanden sein, jedoch aber eine unterschiedliche Affinität gegenüber den SVDV-Antikörpern zeigen. Offensichtlich handelt es sich bei PEV8 und PEV10 nicht um identische, aber sehr nahe verwandte Virusstämme (Isolate). Diese enge Verwandtschaft wurde in den bisherigen Untersuchungen zur Serotypisierung von Enteroviren mittels Serumneutralisationstest und Komplementbindungsreaktion nicht festgestellt (26,51,52).

Kreuzreaktivität kann sowohl vom Antigen als auch vom Antikörper aus definiert werden. Karush, F. (48) bezeichnet zwei antigene Determinanten auf verschiedenen Antigenen kreuzreaktiv, wenn sie von einem spezifischen Antikörper erkannt werden. Werden von einem Epitop unterschiedliche Antikörper induziert, von denen nur ein Teil ein anderes Epitop erkennt, so sind nicht die Epitope kreuzreaktiv, sondern die Antikörper, die beide antigene Determinanten erkennen. Kreuzreaktionen werden auch durch die Affinität oder die Konzentration der Antikörper geprägt. Die meisten Tests erlauben keine Unterscheidung dieser beiden Parameter. Nach Berzofsky u. Schechter (5) sind zwei Typen der Kreuzreaktivität mittels Radioimmunotest nachweisbar. Die Kreuzreaktivität von Typ 1 wird als "wahre Kreuzreaktivität" bezeichnet und umfaßt die Fähigkeit zweier Liganden mit derselben Bindungsstelle des Antikörpermoleküls mit

unterschiedlicher Affinität zu reagieren. Bei Proteinen verändert sich die Affinität unter anderem durch kleine Austausche (z.B. Threonin statt Serin), Deletionen in der Primärsequenz oder durch Konformationsänderungen (Fragmentieren), wenn alle Bindungsstellen auf einem Fragment zu finden sind. Der Typ 2 wird als geteilte Kreuzreaktivität bezeichnet und stellt die Reaktion einer Antikörper-Subpopulation mit gleicher Affinität gegenüber dem heterologen Antigen dar. Während auf einem Protein mehrere Bindungsstellen vorliegen, ist auf dem anderen Protein nur eine Bindungsstelle für den entsprechenden Antikörper zugänglich. Obgleich die bindenden Antikörper zu beiden Proteinen gleiche Affinität aufweisen, erscheint die Kreuzreaktion mit dem heterologen Protein schwächer. Beide Typen können gleichzeitig auftreten. Die Reaktion von Typ 1 wird dabei als hochspezifisch bezeichnet und die Affinität gegenüber dem homologen Antigen ist deutlich höher als gegenüber dem heterologen Reaktionspartner. Typ 2-Reaktionen werden als relativ spezifisch oder selektiv bezeichnet und beruhen auf relativen Konzentrationen, nicht auf Affinitäten.

Kreuzreaktionen zwischen einzelnen Serotypen porziner Enteroviren wurden von Knowles u. Mitarb. (51) beschrieben, wobei zur Herstellung spezifischer Antiseren gnotobiotische Schweine und Meerschweinchen verwendet wurden. Das PEV1-Antiserum reagierte mit PEV4 und PEV6 und das PEV6-Antiserum mit PEV7. Keiner der Kreuzneutralisationstiter überschritt jedoch 5 % der homologen Titer. Mit Ausnahme des Serotyps PEV8 und PEV10 wurden auch in den vorliegenden Untersuchungen in der Regel keine Kreuzneutralisationstiter größer als 5 % des homologen Titer zwischen den Virusstämmen PEV1 bis PEV11 ermittelt. Höhere relative Kreuzneutralisationstiter finden sich mit PEV10-Antiserum nach Zweitimmunisierung gegenüber PEV3, mit PEV9-Antiserum nach Zweitimmunisierung gegenüber PEV7 sowie mit PEV11-Antiserum nach Zweitimmunisierung gegenüber PEV6. Im Falle der PEV10-Antikörper ist diese Kreuzreaktivität verbunden mit einem Titerabfall gegen das Immunogen nach Zweitimmunisierung. Somit wäre eine Toleranzausbildung durch Neutralisationsepitop-spezifische T-Suppressor-Zellen oder auto-anti-idiotypische Antikörper vorstellbar. In diesem Falle müßte es sich um eine Kreuzreaktivität vom Typ 2 handeln. Mit SVDV wurden bei den Untersuchungen von Knowles u. Mitarb. keine Kreuzneutralisationen gegen PEV festgestellt (51). In den vorliegenden Untersuchungen

konnten ebenfalls mit keinem der getesteten PEV-Antiseren Kreuzneutralisationstiter $>1:8$ mit SVDV festgestellt werden. Titer bis $1:8$ wurden nur mit Antiseren, deren homologer Neutralisationstiter mindestens $1:2048$ betrug, gefunden.

Während Cocksackie-Antiseren eine Kreuzreaktivität von maximal 6,25 % des homologen Titers mit porzinen Enteroviren aufwiesen, wurden signifikant höhere kreuzreaktive Antikörpertiter mit den SVDV-Isolaten festgestellt. Keine Kreuzneutralisationen traten mit Cocksackie B1 und B6 auf.

Die durch Immunisierung mit Cocksackie B2-Antigen produzierten Cocksackie-B2-Antiseren enthalten bis zu vierfach höhere kreuzreaktive neutralisierende Antikörpertiter gegen Cocksackie B1. Stärkere Reaktionen mit dem heterologen Antigen werden "Heteroclicity" genannt, wobei das induzierende Antigen als "Heteroclitic" bezeichnet wird. Dieser Mechanismus wurde unter anderem durch Mäkelä u. Mitarb. (64) untersucht. Sie konnten durch Immunisierung von C57BL/10 Mäusen mit dem Hapten Nitrophenylacetyl (NP) höhere Antikörpertiter gegen das heterologe Antigen Nitro-iodophenylacetyl erzeugen. Für die einseitige neutralisierende Kreuzreaktivität von Cocksackie B2-Antikörpern gegenüber Cocksackie B1 muß eine Kreuzreaktivität vom Typ 2 angenommen werden. Die starke Kreuzneutralisation von Cocksackie B1 und ECHO7 durch Cocksackie B3-Antikörper ist nicht eindeutig, da es sich bei dem von uns verwendeten Cocksackie B3-Antigen um ein schwaches Immunogen handelte und oben beschriebene Toleranzmechanismen den Grad der Kreuzneutralisation möglicherweise wesentlich beeinflusst haben könnten.

Das Cocksackie A9-Antiserum neutralisierte die heterologen Antigene Cocksackie A16, B5 und SVDV ähnlich stark wie das homologe Antigen. Das Cocksackie A16-Antiserum unterschied sich hinsichtlich der homologen und der heterologen Neutralisationstiter gegenüber Cocksackie A9 nicht von dem Cocksackie A9-Antiserum, jedoch waren durch geringe, aber signifikante heterologe Titer unterschiedliche Reaktionen mit SVDV und Cocksackie B5 festzustellen. Kreuzneutralisationen der Cocksackie A16-Antikörper vom Typ 2 können mit Cocksackie A9 ausgeschlossen werden. Die Reaktionen gegenüber Cocksackie B5 und den SVDV-Stämmen können nicht einem bestimmten Kreuzreaktivitätstyp zugeordnet werden. Da die kreuzreaktiven Titer der SVDV- und Cocksackie B5-Antiseren keine unterschiedlichen heterologen Reaktionen mit

Coxsackie A9 und A16 aufwiesen, erscheint das Vorkommen verschiedener Subpopulationen von Typ 2-Antikörpern unwahrscheinlich. Coxsackie B4-Antikörper zeigen auf Grund der niedrigen neutralisierenden Antikörpertiter eine sehr schwache Affinität gegenüber den SVDV-Stämmen sowie Coxsackie B1 und Coxsackie B6. Die Coxsackie B5-Antikörper waren nicht in der Lage homologe Neutralisationsreaktionen von heterologen mit Coxsackie A9 zu unterscheiden. Allerdings wiesen sie ebenfalls deutlich geringere Affinität beziehungsweise eine verminderte Anzahl reaktiver Antikörpersubpopulationen gegenüber den SVDV-Stämmen auf. Dies zeigt, daß Coxsackie B5 mit den beiden menschlichen Coxsackieviren A9 und A16 näher verwandt ist als mit SVDV. Mit den Antiseren von A9, A16 und B5 sowie SVDV ist somit keine eindeutige Serotypisierung der homologen Antigene möglich. Die einzelnen Antiseren unterscheiden sich jedoch in den heterologen neutralisierenden Antikörpern.

Die SVDV-Antiseren wiesen sowohl gegen die einzelnen SVDV-Antigene als auch gegen Coxsackie A9, A16 und B5 hohe Kreuzneutralisationstiter auf. Lediglich mit Coxsackie B4 konnte nur eine relativ schwache Kreuzreaktivität festgestellt werden.

Die Kreuzneutralisationstiter werden durch die Bildung von Antikörpern gegen die an der Virionoberfläche exprimierten neutralisierenden Epitope des applizierten Antigens bewirkt. Bei diesen antigenen Determinanten handelt es sich um Aminosäurereste, sogenannte Kontaktreste mit hydrophilen Eigenschaften. Die Antikörper-Antigen-Bindung erfolgt meist durch polare Interaktionen. Allerdings können hydrophobe Determinanten auch mit hydrophoben Bereichen des Antikörpers interagieren. Dabei kommt es durch die Wasserverdrängung zu sehr stabilen Verbindungen (7). Da das VP1 des Maul-und-Klauenseuchevirus als sehr hydrophobes Protein bekannt ist, können hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Picornavirusantigenen nicht ausgeschlossen werden. Die Stärke dieser Reaktion wird durch Anzahl und Affinität der gebildeten Antikörper bestimmt und ist ein Maß für die antigene Verwandtschaft der beiden Antigene.

Das SVD UKG 72/27-Antiserum zeigt keine deutlichen Unterschiede in seinem Reaktionsmuster zu den einzelnen SVDV-Isolaten sowie Coxsackie A9 und A16, es weist jedoch geringere Titer gegen Coxsackie B5 auf. Das Antiserum von SVD BFA reagiert mit allen anderen SVDV-Isolaten sowie Coxsackie A9 und A16. Gegen Coxsackie B5 reagierte das Antiserum

ohne signifikante Unterschiede zum homologen Antigen. Mit einigen dieser Antigene wurde "Heteroclicity" beobachtet. Das SVD 6629-Antiserum reagiert deutlich schwächer gegen SVD BFA, Coxsackie A9, A16 und B5. Diese Ergebnisse zeigen die Heterogenität der einzelnen SVDV-Isolate, wobei ähnliche Schwankungen innerhalb der Gruppe der SVDV-Isolate, der Coxsackie A9-, A16- und B5-Isolate sowie zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden. Die Vermutung von Golding u. Mitarb. (38), daß dem Auftreten von SVDV-Antiköpertitern in Schweinen eine serologische Kreuzreaktivität mit porzinen Enteroviren zugrunde liegen könnte, wurde anhand der Daten im Serumneutralisationstest nicht bestätigt. Die vorliegenden Ergebnisse korrelieren aber mit Beobachtungen von Knowles u. Mitarb. (51), die PEV1-11 und SVD UKG 72/27 auf Kreuzneutralisation untersuchten und keine Reaktionen über 5 % des homologen Serumtiters feststellten.

Weiterhin stimmen unsere Daten mit den SVDV-Studien bezüglich Coxsackie B3, B5 und dem humanen Enterovirus Typ 70 überein, in denen sie lediglich eine Kreuzneutralisation zwischen Coxsackie B5 und SVDV nachwiesen. Die antigenen Verwandtschaften des SVDV zu Coxsackie B5-Virus sind auch von anderen bereits beschrieben worden(12,13,69).

Das Feldisolat DS1734 wurde der BFAV als Zellkulturisolat aus Schweinematerial mit dem Verdacht auf Virus der "Ansteckenden Schweinelähmung" zur Diagnostik eingeschickt. Aufgrund seiner Herkunft, seiner spezifischen Dichte, seines Verhaltens in der Zellkultur sowie seines Proteinmusters läßt sich dieses Isolat in die Gruppe der porzinen Enteroviren einordnen. Das Antiserum von PEV11 reagierte mit dem heterologen DS1734-Antigen mit einem dem homologen Neutralisationstiter identischen Neutralisationstiter. Dagegen zeigte das DS1734-Antiserum keine Kreuzneutralisationstiter $>1:128$ mit anderen porzinen Enteroviren. Das PEV11-Antiserum reagierte mit bestimmten neutralisierenden Epiotopen von DS1734, jedoch waren die von PEV11 exprimierten Epitope für DS1734-Antikörper nicht erkennbar. Somit unterscheidet sich DS1734 von PEV11 durch die Sequenz oder Konformation der neutralisierenden Epitope. Es könnte sich bei diesem Isolat um ein bisher noch nicht klassifiziertes porzines Enterovirus handeln. Nicht klassifizierbare Enteroviren wurden auch von Knowles, N.J. (53) beschrieben.

Eine Kreuzreaktion von SVDV-Seren mit Coxsackievirusstämmen sowie eine Heterogenität der SVDV-Isolate zeigten sich auch im

Neutralisationstest mit Schweinefeldseren gegen die Antigene von SVD UKG 72727 und SVD 6629 sowie gegen Coxsackie B5, A9 und A16. Dabei wurden unter anderem sehr stark abweichende Titer gegen SVD 6629 und SVD UKG 72/27 erhalten. Das SVD-Isolat 6629 unterscheidet sich somit deutlich von dem Isolat SVD UKG 72/27. Die Heterogenität kann entweder Folge unterschiedlicher SVDV-Typen oder entstandener Mutanten sein. Derartige Mutationen wurden bei Coxsackie B4 nachgewiesen. Prabhakar u. Mitarb. (74) passagierten diesen Virusstamm in der Zellkultur und beobachteten mit Hilfe monoklonaler Antikörper eine Antigenkonfigurationsänderung. Sie fanden, daß bereits nach der ersten Viruspassage bestimmte Epitope durch monoklonale Antikörper nicht mehr erkannt wurden. Neben diesen diskontinuierlichen Epitopen traten jedoch auch stark konservierte Epitope auf. Mit polyklonalen Antiseren konnten alle Mutanten neutralisiert werden, was auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen diese stark konservierten Epitope hinweist. Die Autoren machten Punktmutationen für das Verschwinden und Neuerscheinen bestimmter Epitope nach Passagierung verantwortlich. Sie erklärten diesen Vorgang durch Replikationsfehler der Virus-RNA verbunden mit einer hohen Konfigurationsänderungsrate verschiedener viraler Proteine. Da es sich bei den von uns verwendeten Feldseren um polyklonale Seren handelt, sollten Mutanten jedoch in jedem Falle erkannt werden. Die mit dem Serum 3230 ermittelte streng homologe Reaktion mit dem Isolat 6629 steht im Widerspruch zu den Kreuzreaktionen, die mit den anderen untersuchten Feldseren sowie den Kaninchenimmunseren erhalten wurden. Da die Antikörper in Feldseren jedoch im Verlauf einer Infektion induziert werden und das Serum 3230 einen nicht definierten Zeitwert wiedergibt, können zum vorliegenden Zeitpunkt auftretende spezifische T-Helfer- oder T-Suppressor-Funktionen bei der Entstehung derartiger Reaktionsmuster nicht ausgeschlossen werden.

Bei einigen Feldseren traten Antikörpertiter gegen die untersuchten Coxsackie-Stämme und gegen die einzelnen SVDV-Isolate auf, andere enthielten dagegen ausschließlich Antikörper gegen Coxsackie-Antigene. Während im ersten Fall "Heteroclicity" nicht ausgeschlossen werden kann, wurden die Antikörper im zweiten Fall höchstwahrscheinlich durch Coxsackie-Virus-Antigene induziert.

Mit Hilfe spezifischer Antiseren wurden die einzelnen Enteroviren in der Radioimmunpräzipitation und dem Western Blot auf homologe sowie

kreuzreaktive Erkennung viraler Proteine geprüft. Da die Proteine der untersuchten Enteroviren unter den üblichen Dissoziierungsbedingungen mit 0,1 % SDS noch als Proteinkomplexe zur Radioimmunpräzipitation vorlagen, verwendeten wir zur Erfassung kreuzreaktiver Proteine die Methode von Dernick u. Mitarb. (21). Diese benützten für die Dissoziation viraler Strukturproteine von Poliovirus einen Lysis-Puffer mit 1 % SDS und kochten die Proben fünf Minuten bei 95°C. In unseren Untersuchungen wurden nach Radioimmunpräzipitation der nicht vollständig dissoziierten Viruspartikel durch die einzelnen Immunseren vorwiegend Proteine im Molekulargewichtsbereich von 8K sowie zwischen 27K und 42K spezifisch erkannt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Tsuda u. Mitarb. (97), wonach beim SVD-Virus die viralen Strukturproteine VP0, VP1, VP2 und VP3 im Molekulargewichtsbereich von 29K bis 37K lagen. Brown u. Mitarb. (14) verglichen die Molekulargewichte aller vier viralen Strukturproteine von verschiedenen SVDV-Isolaten mit denen aus leeren (VP0, VP1 und VP3 enthaltenden) und kompletten (VP1, VP3, VP2 und VP4 enthaltenden) Partikeln verschiedener Isolate von Cocksackievirus B5. Sie fanden einzelne SVDV-Isolate, die in ihrem Proteinmuster eine große Ähnlichkeit untereinander aufweisen und SVDV-Isolate, die sich in ihrem Proteinmuster deutlich von diesen Isolaten unterscheiden und starke Ähnlichkeit zu einzelnen Cocksackie-Isolaten haben. So differierten die in Italien 1966 sowie die in Hongkong 1971 isolierten Stämme in ihren Proteinmustern deutlich von den in England, Österreich und Italien in dem Jahren 1972-1973 isolierten SVD-Stämmen. Sie folgerten daraus, daß die Ausbrüche der Jahre 1972/73 anderen Ursprungs waren als die Ausbrüche in Italien 1966 und Hongkong 1971. Bei ihren Untersuchungen war auffallend, daß das Frankreich-Isolat 1/73 eine größere Ähnlichkeit mit Cocksackie B5 als mit den von ihnen untersuchten restlichen europäischen SVDV-Isolaten aufwies. Da bei der Auftrennung viraler Strukturproteine unter verschiedenen Elektrophoresebedingungen, bedingt durch Größe und Ladung der einzelnen Proteine, unterschiedliche Laufmuster in der PAGE auftreten, richtet sich die neueste Nomenklatur der Strukturproteine nach ihrer Lage auf dem Genom. Es wurde in dieser Arbeit aufgrund bisher unzureichender Untersuchungen zur Genomkartierung auf eine Benennung der einzelnen Strukturproteine nach der internationalen Nomenklatur verzichtet.

Bei dem Nachweis einer größeren Anzahl viraler Strukturproteine bei nicht vollständig dissoziierten gegenüber vollständig dissoziierten Viruspartikeln sind verschiedene Möglichkeiten zu diskutieren. Die stringenteren Bedingungen unter 1 % SDS und fünfminütigem Kochen führen zu einer stärkeren Konfigurationsänderung und somit zur Zerstörung diskontinuierlicher konformativer Epitope, die dann nicht mehr erkannt werden. Weiterhin erkennen nach Berzowsky und Berkower (7) durch native Antigene induzierte Antikörper vorwiegend native Epitope, gegen denaturierte Antigene gerichtete Antikörper dagegen vorwiegend denaturierte Proteine. Da die von uns verwendeten Antiseren durch Verabreichung nativer Virionen hergestellt wurden, wären demnach vorwiegend Antikörper gegen natives Antigen und eine geringere Anzahl erkennbarer Epitope (Proteine) zu erwarten. Lando (61) konnte allerdings mit polyklonalen Seren von Ziegen, Schafen und Kaninchen zeigen, daß 60-70 % der darin enthaltenen Antikörper an Peptide, aber nur 30-40 % an konformationsintakte Antigene binden. Wahrscheinlich werden die Proteine in der Radioimmunpräzipitation als Komplexe gefällt und vor dem Auftragen auf das Gel dissoziiert, so daß alle Proteine des Komplexes nachgewiesen werden. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß nach Präzipitation nicht vollständig dissoziierter SVDV-Partikel mit den verschiedenen Antiseren die viralen Strukturproteine stets im gleichen Mengenverhältnis zueinander nachgewiesen werden. Nach Injektion nativer Virionen in Kaninchen ist zwar eine Prozessierung (Fragmentierung) der Proteine zu erwarten, trotzdem dürften die Antikörper mehrheitlich gegen Oberflächendeterminanten gerichtet sein.

Aus Untersuchungen am Maul-und-Klauenseuche-Virus ist bekannt, daß nicht alle viralen Strukturproteine an der Virusoberfläche exprimiert sind. So können zum Beispiel Antikörper gegen das VP4 erst nach Denaturierung oder Prozessierung des nativen Antigens induziert werden. Während in den vorliegenden Untersuchungen VP4 bei den Enteroviren in Western Blots und in der Radioimmunpräzipitation mit vollständig dissoziiertem Antigen nicht nachgewiesen werden konnte, war dies in der Radioimmunpräzipitation mit nicht dissoziiertem Antigen, d.h. nach Fällung des Proteinkomplexes, möglich. Auch wenn ein Verlust diskontinuierlicher Determinanten nach stringenten Präzipitationsbedingungen nicht ausgeschlossen werden kann, so ist dennoch davon auszugehen, daß die Mehrheit der Antikörper gegen die

mit dissoziierten Antigenen gefällten Proteine gerichtet sind. Das VP4 wird mit nicht vollständig dissoziiertem Antigen über den Protein-komplex gefällt und in der Radioimmunpräzipitation nachgewiesen.

Die hergestellten Kaninchen-Immunsereen gegen die porzinen Enteroviren reagierten im Western Blot und in der Radioimmunpräzipitation mit vollständig dissoziiertem Antigen vorwiegend gegen ein virales Strukturprotein mit einem errechneten Molekulargewicht zwischen 34 und 38K. Bei PEV1 bis 7 und 11 sowie DS1734 handelt es sich dabei um das virale Protein mit der zweitkürzesten Laufstrecke im Gel. Bei PEV8, 9 und 10 wird dagegen das Protein mit der kürzesten Laufstrecke im Gel erkannt. Diese Serotypen zeichnen sich durch relativ geringe Neutralisationstiter, trotz teilweise dreimaliger Immunisierung, aus. Weitergehende Untersuchungen sind notwendig um abzuklären, ob es sich bei PEV1 bis 7 und 11 sowie DS1734 um das VP2, bei PEV8, 9 und 10 aber um das VP1 handelt und die unterschiedlich starke Induktion neutralisierender Antikörper damit in Zusammenhang steht. Die Coxsackie- und SVDV-Antiseren erkennen in der Regel zwei bis drei virale Strukturproteine, wobei ein virales Protein im Bereich 33-35K hauptsächlich erkannt wird. Dieses Protein stellt das Protein mit der zweitkürzesten Laufstrecke im Gel dar. Nach Benennung gemäß des Laufverhaltens im Gel würde es sich hierbei um das VP2 handeln, dem bei Coxsackieviren sowie unter anderem bei SVDV die Induktion neutralisierender Antikörper zugeschrieben wird (3,97). Die Proteinnomenklatur ist aber durch Genomkartierung nachzuprüfen. Kreuzneutralisierende Antiseren waren stets in der Lage das heterogene 33-35K-Protein auch im Western Blot beziehungsweise in der Radioimmunpräzipitation zu erkennen.

In der Radioimmunpräzipitation mit dissoziiertem Antigen werden von dem anti-SVD UKG 72/27-Serum vier Proteine des Coxsackie-Virus B2, von dessen homologen Antiserum dagegen nur drei Proteine erkannt. Bei Coxsackie B5 wird von zwei SVDV-Antiseren im Gegensatz zu der homologen Reaktion auch das VP4 erkannt. Entweder exprimierten diese beiden Coxsackie-Stämme das entsprechende Epitop während der Immunisierung nicht auf der Virusoberfläche oder die Determinante für dieses Protein wurde nicht fragmentiert, so daß Antikörper dagegen nicht induziert werden konnten. Da das freigelegte denaturierte Epitop von SVDV-Antiseren erkannt wird, muß davon ausgegangen werden, daß die entsprechende Determinante auf dem SVDV-Antigen erkannt und somit

kreuzreaktive Antikörper gebildet werden konnten. Eine weniger wahrscheinliche Möglichkeit wäre das Vorliegen einer "Heteroclicity". Mit PEV8 fand in der Radioimmunpräzipitation eine schwache, im Western Blot eine deutliche Reaktion des anti-SVDV-Serums mit einem 30.5K und einem 32K-Protein statt. Das homologe Antiserum erkannte diese beiden Proteine mit nicht dissoziiertem Antigen nicht und mit dissoziiertem Antigen nur sehr schwach. Das sehr schwache Signal der 30.5K- und 32K-Bande im Vergleich zu den anderen Strukturproteinen des ^{35}S -Methionin markierten, nicht vollständig dissoziierten PEV8 (siehe auch PEV10) läßt auf eine geringe radioaktive Markierung dieser Proteine schließen und wäre durch einen geringen Gehalt an Methionin in diesen Proteinen erklärbar. Der deutliche Nachweis dieser Proteine mit dem SVDV-Antiserum im Western Blot zeigt, daß eine effiziente Bindung der Antikörper an die Antigene erfolgt. Da eine derartige Bindung auch in der Radioimmunpräzipitation erwartet werden muß, können die geringen Signale nicht auf geringe Mengen präzipitierter Proteine, sondern nur auf niedrigen radioaktiven Einbauraten beruhen. Die Erkennung der 30.5K- und 32K-Proteine durch das SVDV-Antiserum könnte darauf zurückzuführen sein, daß die analogen Epitope zu diesen Proteinen im SVD-Viruspartikel als erkennbare Determinanten exprimiert werden und somit Antikörper induzieren, die zu einer heterologen Erkennung auf dissoziierten und nicht dissoziierten Antigenen führen. Mit den Antiseren von PEV1, PEV3, PEV4, PEV6 und PEV8 fand gegen dissoziiertes homologes Antigen eine Reaktion mit Proteinen eines Molekulargewichts zwischen 15K und 25K statt, wobei mit dem anti-PEV4- und anti-PEV8-Serum die Reaktion mit jeweils zwei Proteinen am deutlichsten war. Auffallend ist, daß diese Proteine nur in der Radioimmunpräzipitation mit dissoziiertem Antigen in Erscheinung treten. Es kann sich dabei um unspezifische Reaktionen handeln, bei denen durch stringente Dissoziierungsmaßnahmen eine Konfigurationsänderung viraler Strukturproteine hervorgerufen wurde, die es unspezifischen Proteinen erlaubt an die viralen Strukturproteine zu binden. Diese nicht viralen Proteine werden als "clumping-Proteine" mitgerissen und erkannt. Derartige "clumping-Proteine" werden unter anderem bei dem Maul-und-Klauenseuche-Virus in Verbindung mit dem dissoziierten VP1 nachgewiesen. Hierbei kommt es auf Grund der starken hydrophoben Eigenschaften dieses Proteins zu hydrophoben Wechselwirkungen mit nicht-viralen Proteinen (E.Pfaff, persönliche

Mitteilung). Weiterhin ist eine Fragmentierung oder Degradierung eines Teils der viralen Strukturproteine durch die angewendeten stringenten Bedingungen denkbar, wobei die dabei entstehenden Bruchstücke als niedermolekulare Proteinbanden nachweisbar wären.

Die hochmolekularen Banden, die bei Coxsackie B5 und B6 im RIP auftreten, könnten Nichtstrukturproteine oder Vorläuferproteine darstellen. Da die Proteine jedoch nach Präzipitation sowohl mit dem Immunserum als auch mit dem Präimmunserum gefunden werden, sind sie weder virale noch virusinduzierte Proteine.

Bei dem Vergleich der Reaktionsmuster verschiedener Antiseren mit nicht dissoziiertem SVD UKG 72/27-Antigen sowie dissoziiertem Antigen lassen sich mit dissoziiertem Antigen weniger kreuzreaktive Antikörper feststellen als mit nicht dissoziiertem Antigen. Durch die stringente Behandlung des Antigens mit dem Ziel der Dissoziation könnten diskontinuierliche Epitope zerstört worden sein, die von den einzelnen Antiseren nicht mehr erkannt werden konnten. Die ermittelten Kreuzreaktionen der PEV-Antiseren mit nicht vollständig dissoziiertem SVDV-Antigen stellen in der Regel sehr schwache Signale dar. Die Reaktionsbreite kann durch schwach affine gemeinsame Determinanten bedingt sein, wobei die Erkennbarkeit derartiger Determinanten auf den Proteinen durch die Ausbildung antigener Domänen begünstigt wird. Proteine weisen nämlich Bereiche auf, in denen keine oder nur wenige Erkennungsstellen liegen und Abschnitte, mit einer Häufung von Epitopen (6,28,29,43). Breite Kreuzreaktivitätsspektren werden teilweise auch durch die Multispezifität erklärt (44,45,75,94). Diese Theorie besagt, daß gegen das Immunogen Subpopulationen von Antikörpern mit geringer Affinität gebildet werden. Derartige Antikörper könnten aber hochaffine Antikörper mit Typ 1-Spezifität für ein heterologes Antigen darstellen und somit die Reaktionsbreite des Immunsystems erweitern. Auf Grund Fehlens Typ 1-spezifischer Kreuzreaktivität kann die Multispezifität im vorliegenden Fall als Ursache ausgeschlossen werden.

Mit kreuzneutralisierenden SVDV-Antikörpern wird in der Radioimmunpräzipitation und im Western Blot bei Coxsackie-Viren stets ein Protein zwischen 33K und 35K gefällt. Es liegt nahe, daß sich auf diesem Protein ein für die Neutralisation verantwortliches Epitop befindet. Diese Vermutung wird anhand von Coxsackievirus B6 erhärtet, das mit SVDV-Seren keine Kreuzneutralisation gab und dessen

33K-Protein von den SVDV-Antiseren im Western Blot nicht gefällt wurde. Die fehlende Kreuzneutralisation zwischen porcinen und bovinen Enteroviren einerseits und SVDV andererseits wurde im RIP und im Western Blot durch negative oder schwache Kreuzreaktionen mit den SVDV-Viren bestätigt. Hingegen traten mit Ausnahme von Coxsackie B1 und B6 deutliche Kreuzreaktionen zwischen SVDV und den Coxsackie-Virus-Stämmen auf.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß neutralisierende Antikörper gegen SVDV-Isolate sowohl von diesen als auch von den humanen Coxsackieviren A9, A16, B4 und B5 sowie möglicherweise weiteren nicht untersuchten Coxsackieviren hervorgerufen werden. Die Antikörper treten auch unter natürlichen Bedingungen nach Infektion im Schwein auf. Die Daten zeigen weiter, daß es sich bei den SVDV-Isolaten nicht um einen einheitlichen Erreger handelt, sondern ähnliche Heterogenitäten auftreten wie zwischen Coxsackie A9, A16 und B5.

Da das Coxsackie-Virus B5 auch Schweine infizieren und dort ähnliche histopathologische Veränderungen wie nach Infektion mit einem SVDV hervorrufen kann (69) und umgekehrt Infektionen des Menschen mit SVDV beschrieben worden sind (15), besitzen dieses Coxsackie-Virus und SVDV sowohl ein humanes als auch ein porcines Wirtsspektrum. Vergleichbare Verhältnisse könnten auch bei anderen Coxsackie-Viren und insbesondere bei Coxsackie A9 und A16 vorliegen, da diese Stämme eine sehr enge Verwandtschaft zu Coxsackie B5 und den SVDV-Isolaten aufweisen. SVD-Viren dürften als an das Schwein adaptierte Coxsackie-Viren zu betrachten sein. Die vesikuläre Schweinekrankheit wäre somit als eine durch hochpathogene porcine Coxsackieviren verursachte, mit dem klinischen Bild der SVD einhergehende Infektion, neu zu definieren.

Es bleibt offen, wie häufig humane Coxsackieviren zu milden Infektionen beim Schwein führen und somit kreuzreaktive Neutralisationstiter hervorrufen können. Durch die ubiquitäre Verbreitung von Coxsackieviren in der menschlichen Population ist nicht auszuschließen, daß Coxsackie-Viren leicht auf das Schwein übertragen werden. Durch Fehler bei der viralen RNA-Replikation, die als Ursache von Mutationen bei Coxsackie B4 angesehen werden (74), könnte ein für das Schwein hochpathogenes Virus entstehen und zu einer SVD-Epidemie führen. Das sehr seltene Auftreten der SVD weist jedoch darauf hin, daß dieses Ereignis nur gelegentlich eintritt. Die im Falle von SVD sehr strikten Bekämpfungsmaßnahmen (Keulung aller Tiere)

unterbrechen die Infektionskette, so daß eine Ausbreitung SVD-verursachender Coxsackieviren verhindert wird. Auf Grund der Adaptation des SVD-Virus an das Schwein und der hohen Coxsackie-Antikörpertiter beim Menschen, stellt das SVDV des Schweines keine besondere Infektionsquelle für den Mensch dar.

Niedrige neutralisierende SVDV-Antikörpertiter in der Diagnostik können durch humane Coxsackieviren verursacht sein, während hohe Titer auf porcine Coxsackieviren hinweisen. Der Anteil der schwach Antikörper-positiven Tiere in der Schweinepopulation beträgt maximal 5 %. Dies deutet darauf hin, daß derzeit porcine Coxsackie-Viren in der Bundesrepublik Deutschland epidemiologisch keine Rolle spielen, sondern humane Coxsackie-Viren für die Antikörperbildung verantwortlich sind.

6. Zusammenfassung

In der Exportdiagnostik von Schweinen wurden wiederholt neutralisierende SVDV-Antikörpertiter ermittelt, obwohl zu keinem Zeitpunkt klinische Symptome bei den Tieren auftraten. Die vorliegende Arbeit sollte klären, ob es sich hierbei um spezifische SVDV-Titer oder um kreuzreaktive Titer mit anderen Enteroviren des Schweines, des Rindes, oder des Menschen handelt. Spezifische in Kaninchen gewonnene Antiseren gegen die porcinen Enteroviren PEV1-11 (ECSO) und das Feldisolat DS1734, die beiden bovinen Enteroviren LCR4 und CBV-D (ECB0), das humane Enterovirus ECH07 sowie die Coxsackieviren B1-B6, A9 und A16 wurden auf kreuzreaktive neutralisierende Antikörper untersucht. Die Seren zeigten vorwiegend homologe Reaktivität mit einem Protein im Molekulargewichtsbereich von 33-35K, das nach dem Laufverhalten in der Polyacrylamidgelelektrophorese bei Coxsackie, SVDV sowie PEV1-7, PEV11 und DS1734 als VP2, bei PEV8-10 als VP1 angesprochen werden müßte. Diese Seren dienten weiterhin in der Radioimmunpräzipitation sowie dem Western Blot zum Nachweis kreuzreaktiver Antigene.

Antiseren gegen das humane, die porcinen und bovinen Enteroviren wiesen trotz sehr hoher homologer Antikörpertiter in der Regel zu keinem Zeitpunkt neutralisierende Antikörper gegen SVDV auf. Nur in Ausnahmefällen kam es zu Titerwerten bis maximal 1:8. Dagegen wurden signifikante kreuzreaktive neutralisierende Antikörpertiter gegen Coxsackie B4, B5, A9 und A16 nachgewiesen.

Radioimmunpräzipitation und Western Blot ergaben, daß die ECB0- und ECH0-Antiseren keine kreuzreaktiven Antigene erkannten und die ECSO-Antiseren nur schwach mit vorwiegend wenig stabilen konformationellen Epitopen der SVD-Viren reagierten. Starke antigene Verwandtschaften, die zum Teil alle viralen Strukturproteine betrafen, waren jedoch zwischen den SVDV-Isolaten und den Coxsackie B4-, B5-, A9- und A16-Viren festzustellen.

Bezüglich der antigenen Verwandtschaft als auch der neutralisierenden Antikörper erwiesen sich die drei untersuchten SVDV-Isolate UKG 72/27 (Pirbright), SVD BFA (Laborstamm) sowie SVD 6629 (Freudenstadt) als nicht einheitlich. Es wurden Unterschiede festgestellt, wie sie auch in den verschiedenen Coxsackie A- und B-Serotypen auftraten.

SVD wird somit nicht von einem eigenständig zu klassifizierenden SVDV, sondern von verschiedenen den porcinen Coxsackieviren zugehörigen

Isolaten verursacht. Die vesikuläre Schweinekrankheit wäre deshalb als eine durch hochpathogene porcine Cocksackieviren hervorgerufene, mit dem klinischen Bild der SVD einhergehende Infektion neu zu definieren. Es bleibt zu klären, ob humane Cocksackieviren nach Adaptation im Schwein das klinische Bild der vesikulären Schweinekrankheit hervorrufen können. Sollte dies möglich sein, so zeigt die gegenwärtige epidemiologische Situation bei SVD, daß dieses Ereignis nur extrem selten auftreten würde.

6. Summary

Antigenic Relationship between the Virus of Swine Vesicular Disease (SVDV) and other Porcine Enteroviruses as well as Selected Human and Bovine Enteroviruses

Sera from pigs destined for export repeatedly exhibited neutralizing antibody titers against SVDV, although at no time clinical symptoms could be observed. The study presented here was performed to clarify whether these represent SVDV-specific titers or antibodies cross-reacting with other enteroviruses of either pig, cattle or human origin. Specific rabbit antisera against porcine enteroviruses PEV1-11 (ECS0) and the field-isolate DS1734, the bovine enteroviruses LCR4 and CBV-D (ECB0), human enterovirus ECH07 as well as Coxsackieviruses B1-B6, A9 and A16 were tested for crossreacting neutralizing antibodies. Most prominently the sera showed homologous reaction with a protein of approximate molecular weight 33-35K, which according to characteristics in the polyacrylamidegel electrophoresis in Coxsackie, SVDV and PEV1-7, PEV11 and DS1734 has to be identified as VP2, whereas in PEV8-10 it appears to correlate with VP1.

These sera furthermore served in radioimmunoprecipitation and Western blot for the detection of cross-reacting antigens.

Antisera against human, porcine and bovine enteroviruses never exhibited neutralizing antibodies against SVDV in spite of high homologous antibody titers. Only in rare cases titers up to a maximum of 1:8 could be found. In contrast significant cross-reacting neutralizing antibody titers among Coxsackie B4, B5, A9 and A16 were demonstrated.

Radioimmunoprecipitation and Western blot showed that sera against the ECB0- and ECHO-viruses were not capable of detecting cross-reacting antigens. Sera against ECS0-viruses reacted only weakly with predominantly less stable conformational epitopes of SVD-viruses. However, strong antigenic relationships which in some cases were found between all viral structural proteins could be demonstrated between the SVDV-isolates and the Coxsackie B4-, B5-, A9- and A16-viruses. Regarding antigenic relationship as well as neutralizing antibodies the three SVDV-isolates UKG 72/27 (Pirbright), SVD BFA (laboratory

strain) and SVD 6629 (Freudenstadt) exhibited differences as did the various Coxsackie A- and B-serotypes.

We conclude that SVD therefore is not caused by a specifically classified SVD-virus but by different isolates belonging to various "porcine Coxsackieviruses". Swine vesicular disease therefore had to be defined as an infection caused by highly pathogenic porcine Coxsackieviruses leading to the SVD-typical clinical symptoms.

It remains to be clarified whether human Coxsackieviruses are able to induce clinical symptoms resembling of swine vesicular disease after adaption in pigs. Should this be possible the present epidemiological situation in SVD proves that this event does occur only very rarely.

7. Literaturverzeichnis

1. Alexander, T.J.L., A.O. Betts, 1967: Further studies on porcine enteroviruses isolated at Cambridge. II. Serological grouping. *Res.Vet.Sci.* 8, 330-337.
2. Bach, M.K., J.R. Brashler, 1975: IgE antibody-specific abrogation of an established immune response in mice by modified antigens. *J.Immunol.* 114, 1799-1807.
3. Beatrice, S.T., M.G. Katze, B.A. Zajak, R.L. Crowell, 1980: Induction of Neutralizing Antibodies by the Coxsackievirus B3 Virion Polypeptide VP2. *Virology* 104, 426-438.
4. Becker, W., 1975: Die Vesikuläre Schweinekrankheit. *Tierärztl. Umsch.* 30, 231-236.
5. Berzofsky, J.A., A.N. Schechter, 1981: The concepts of cross-reactivity and specificity in immunology. *Mol.Immunol.* 18, 751-763.
6. Berzowsky, J.A., Buckenmeyer, G.K., Hicks, G., Gurd, F.R.N., Feldmann, R.J., and Minna, J., 1982: Topographic antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies to sperm whale myoglobin. *J.Biol.Chem.* 257, 3189-3198.
7. Berzowsky, J.A. and I.J. Berkower, 1984: Antigen-Antibody Interaction. In: *Fundamental Immunology*, ed. by W.E. Paul, Raven Press, New York. 595-644.
8. Betts, A.O., 1960: Studies on enteroviruses of the pig. II: The effect of temperature, ultra-violet light, and ether on the T80 strain of polioencephalomyelitis virus. *Res.Vet.Sci.* 1, 57-65.
9. Betts, A.O., D.F. Kelly, P.H. Lamont, B.E. Sheffy, 1961: The isolation and characterisation of some enteroviruses from pigs. *Vet.Rec.* 73, 752-755.
10. Binz, H., H. Wigzell, 1976: Specific transplantation tolerance induced by autoimmunization against the individual's own, naturally occurring idiotypic, antigen-binding receptors. *J.Exp.Med.* 144, 1438-1457.
11. Binz, H., and Wigzell, H., 1979: Induction of Specific Transplantation Tolerance in Adult Animals. *Transplant.Proc.* 11, 914-918.
12. Brown, F., P. Talbot, R. Burrows, 1973: Antigenic differences

- between isolates of swine vesicular disease virus and their relationship to coxsackie B5 virus. *Nature* 245, 315-316.
13. Brown, F., P. Talbot, R. Burrows, 1973: Serological Relationship of Swine Vesicular Disease Virus and Coxsackie B5 Virus. *Nature* 245, 314-316.
 14. Brown, F., T.J.R. Harris, 1975: Correlation of polypeptid composition with antigenic variation in the swine vesicular disease and coxsackie B5 viruses. *Nature*. 258, 758-760.
 15. Brown, F., D. Goodridge, R. Burrows, 1976: Infection of Man by Swine Vesicular Disease Virus. *J.Comp.Path.* 86, 409-414.
 16. Burrows, R., A. Greig, D. Goodridge, 1973: Swine Vesicular Disease. *Res.Vet.Sci.* 15, 141-144.
 17. Burrows, R., S.A. Mann, D. Goodridge, 1974: Swine vesicular disease: Virological studies of experimental infection produced by the England/72 virus. *J.Hyg.* 72, 135-143.
 18. Burrows, R.J., A. Mann, D. Goodright, 1974: Swine vesicular disease: Comparative studies of viruses isolated from different countries. *J.Hyg.Camb.* 73, 109-117.
 19. Davis, B., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg, 1980: Coxsackieviruses, Echoviruses in: *Microbiology*. Ed. by Davis, Dulbecco, Eisen, Ginsberg, 3th ed. Harper & Row, 1109-1117.
 20. Dawe, P.S., A.J. Forman, C.J. Smale, 1973: A preliminary investigation of the swine vesicular disease epidemic in Britain. *Nature* 241, 540-542.
 21. Dernick, R., J. Heukeshoven, M. Hibrig, 1983: Induction of Neutralizing Antibodies by All Three Structural Poliovirus Polypeptides. *Virology* 130, 243-246.
 22. Diener, E., M. Feldmann, 1970: Antibody-mediated supression of the immune response in vitro. II. A new approach to the phenomenon of immunological tolerance. *J.Exp.Med.* 132, 31-43.
 23. Dhennin, L., L. Dhennin, J.-M. Gourreau, 1973: Swine Vesicular Disease: its appearance in France. *Bull.Acad.Vet.de France* 46, 47-51.
 24. Dunne, H.W., J.L. Gobble, J.F. Hokanson, D.C. Kradel, G.R. Bubash, 1965: Porcine reproductive failure associated with a newly identified "SMEDI" group of picorna viruses. *Am.J.Vet.Res.* 26, 1284-1297.
 25. Dunne, H.W., D.C. Kradel, C.D. Clark, G.R. Bubash, E. Ammerham,

- 1967: Porcine enteroviruses: A serologic comparison of thirty-eight Pennsylvania isolates with other reported North American strains, Teschen, Talfan, and T80 serums-A progress report. *Am.J.Vet.Res.* 28, 557-568.
26. Dunne, H.W., J.T. Wang, E. Ammerham, 1971: Classification of North American porcine enteroviruses: A comparison with European and Japanese strains. *Infect.Immun.* 4, 619-631.
27. Dunne, H.W., 1975: Abortion, stillbirth, fetal death and infectious infertility. In: *Diseases of Swine*. Ed. by H.W. Dunne and A.D. Leman, 4th ed. Iowa University Press, Ames, Iowa, 918-952.
28. East, I.J., Todd, P.E., and Leach, S.J., 1980: On topographic antigenic determinants in myoglobins. *Mol.Immunol.* 17, 519-525.
29. East, I.J., Hurrell, J.G.R., Todd, P.E., and Leach, S.J., 1982: Antigenic specificity of monoclonal antibodies to human myoglobin. *J.Biol.Chem.* 257, 3199-3202.
30. Feldmann, M., J.G. Howard, C. Desaynard, 1975: Role of Antigen Structure in the Discrimination between Tolerance and Immunity by B Cells. *Transplant.Rev.* 23, 78-97.
31. Feldmann, M.B., E. Diener, 1970: Antibody-mediated suppression of the immune response in vitro. I. Evidence for a central effect. *J.Exp.Med.* 131, 247-274.
32. Fernandez, C., and Möller, G., 1979: Antigen-induced strain-specific autoantiidiotypic antibodies modulate the immune response to dextran B 512. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76, 5944-5947.
33. Fernandez, C., G. Möller, 1980: A Primary Immune Response to Dextran B512 is Followed by a Period of Antigen-specific Immunosuppression Caused by Autoanti-idiotypic Antibodies. *Scand.J.Immunol.* 11, 53-62.
34. Frei, P.C., Bennacerraf, B., and Thorbecke, G.J., 1965: Phagocytosis of the antigen, a crucial step in the induction of the primary response. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 53, 20-23.
35. Frei, P.C., S. Cruchaud, L. Arnaudo, A. Vannotti, 1968: Immunologic tolerance induced in the adult rabbit with modified BSA. *J.Immunol.* 101, 605-610.
36. Goldl, E.A., A.P. Schrater, G.W. Siskind, G.J. Thorbecke, 1979: Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response to TNP-Ficoll. II. Hapten-reversible inhibition

- of anti-TNP plaque-forming cells by immune serum as an assay for auto-anti-idiotypic antibody. *J.Exp.Med.* 150, 154-165.
37. Goidl, E.A., Schrater, A.F., Thorbecke, G.J., and Siskind, G.W., 1980: Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response IV. Studies of the primary and secondary responses to thymus-dependent and -independent antigens. *Eur.J.Immunol.* 10, 810-812
38. Golding S.M., R.S. Hedger, P. Talbot, 1976: Radial immuno-diffusion techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. *Res.Vet.Sci.* 20 (2), 142-147.
39. Gorman, B.M., 1975: Plaquing and neutralizing of arboviruses in the PS-EK line of cells. *Austr.J.Med.Techn.* 6, 65-71.
40. Grubman, M.J., Baxt, B., 1982: Translation of Foot-and-Mouth Disease Virion RNA and Processing of the Primary Cleavage Products in a Rabbit Reticulocyte Lysate. *Virology* 116, 19-30.
41. Harding, J.D.J., J.T. Done, G.F. Kershaw, 1957: A transmissible polio-encephalomyelitis of pigs (Talfan disease). *Vet.Rec.* 69, 824-831.
42. Hotchin, J., L.M. Benson, J. Seamer, 1962: Factors affecting the induction of persistent tolerant infection of newborn mice with lymphocytic choriomeningitis. *Virology* 18, 71-78.
43. Hurrell, J.G.R, Smith, J.A., Todd, P.E., and Leach, S.J., 1977: Cross-reactivity between mammalian myoglobins: Linear vs. spatial antigenic determinants. *Immunochemistry* 14, 283-288.
44. Inman, J.K., 1974: Multispecificity of the antibody combining region and antibody diversity. In: *The Immune System: Genes, Receptors, Signals*, ed. by E.E. Sercarz, A.R. Williamson, and C.F. Fox. Academic Press, New York, 37-52.
45. Inman, J.K., 1978: The antibody combining region: Speculations on the hypothesis of general multispecificity. In: *Theoretical Immunology*, ed. by G.I. Bell, A.S. Perelson, and G.H. Pimbley, Jr. Marcel Dekker, New York, 243-278.
46. Ishizaka, K., H. Okudaira, T.P. King, 1975: Immunogenic properties of modified antigen E. II. Ability of urea-denatured antigen and α -polypeptide chain to prime T cells specific for antigen. *Eur.J.Immunol.* 114, 110-115.
47. Kärber, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs*

- Arch.Exp.Path.Pharmak. 162, 480-483.
48. Karush, F., 1978: The affinity of antibody: range, variability, and the role of multivalence. In: Comprehensive Immunology Vol. 5. Immunoglobulins, edited by G.W. Litman and R.A. Good, Plenum Press, New York, 85-116.
 49. Kasza, L., A. Adler., 1965: Biologic and immunologic characterization of 6 swine enteroviruses isolates. Am.J.Vet.Res. 26, 625-630.
 50. Kitamura, N., B. Semmler, P.G. Rothberg, G.R. Larsen, C.J. Adler, A.J. Dorner, E.A. Emini, R. Hanecak, J.J. Lee, S. van der Werf, C.W. Anderson, E. Wimmer., 1981: Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. Nature 291, 547-553.
 51. Knowles, N.J., L.S. Buckley, H.G. Pereira., 1979: Classification of Porcine enteroviruses by antigenic analysis and cytopathic effects in tissue culture: Description of 3 new serotypes. Arch. Virol. 62, 201-208.
 52. Knowles, N.J., L.S. Buckley, 1980: Differentiation of porcine enterovirus serotypes by complement fixation. Res.Vet.Sci. 29, 113-115.
 53. Knowles, N.J., 1983: Isolation and Identification of Porcine Enteroviruses in Great Britain, 1979 to 1980. Br.Vet.J. 139, 19-22.
 54. Kodama M., T. Ogawa, T. Saito, G. Tokuda, J. Sasahara, 1980: Swine vesicular disease viruses isolated from healthy pigs in non-epizootic period. I. Isolation and identification. Natl. Inst.Anim.Health Q (Tokyo) 20 (1), 1-10.
 55. Köhler, H., D.R. Kaplan, D.S. Strayer, 1974: Clonal depletion in neonatal tolerance. Science 186, 643-644.
 56. Kötsche, W., 1969: Die spontanen Enzephalomyelitiden der Maus. In: Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren, Bd.IV. Herausgegeben von H.Röhrer. VEB Gustav Verlag, Jena. 617-654.
 57. Kräusslich, H.G., E. Wimmer, 1988: Viral Proteinases. Ann.Rev. Biochem. 57, 701-754.
 58. Kubin, G., 1973: Auftreten der Vesikulären Virusseuche der Schweine (Swine Vesicular Disease) in Österreich. Wien.tierärztl.Mschr. 60, 283-288.
 59. Laemmli, U.K., 1970: Cleavage of structural proteins during the

- assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
60. Lamont, P.H., A.O. Betts, 1960: Studies on enteroviruses of the pig. IV. The isolation in tissue culture of a possible enteric cytopathogenic swine orphan (ECSO) virus (V13) from the faeces of a pig. *Res.Vet.Sci.* 1, 152-159.
61. Lando, G., Berzofsky, J.A. and Reichlin, M., 1982: Antigenic structure of sperm whale myoglobin: I. Partition of specificities between antibodies reactive with peptides and native proteins. *J.Immunol.* 129, 206-211.
62. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
63. Loxam, J.G., R.S. Hedger, 1983: Swine vesicular disease: clinical signs, diagnosis, epidemiology and control. *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz.* 2, 11-24.
64. Mäkelä, O., K. Karjalainen, 1977: Inherited immunoglobulin idiotypes of the mouse. *Immunol.Rev.* 34, 119-138.
65. Mayer, M., H. Rapp, B. Roizman, W. Klein, K. Cowan, D. Lukens, C. Schwerdt, F. Schaffer, J. Charney, 1957: The Purification of poliomyelitis virus as studied by complement fixation. *J.Immunol.* 78, 435-455.
66. Mayr, A., 1957: Die Diagnose der ansteckenden Schweinelähmung (Teschener Krankheit) mit Hilfe des Serumneutralisationstestes in der Gewebekultur und Bildung, Verweildauer und Ausscheidung von virusneutralisierenden Antikörper im Verlauf einer Erkrankung und bei stummen Infektionen. *Zbl.Vet.Med.* 4, 613-632.
67. Mayr, A., 1962: The Virus of Teschen Disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 101, 423-427.
68. Mitchison, N.A., 1964: Induction of immunological paralysis in two zones of dosage. *Proc.R.Soc.Lond.Biol.* 161, 275ff.
69. Monlux, W.S., P.D. McKercher, J.H. Gaves, 1975: Brain and Spinal Cord Lesions in Pigs Inoculated with Swine Vesicular Disease (UKG Strain) Virus and Coxsackievirus B5. *Am.J.Vet.Res.* 36, 1745-1749.
70. Mowat, G.N., J.H. Darbyshire, J.F. Huntley, 1972: Differentiation of Vesicular Disease of pigs in Hong Kong from Foot-and-Mouth Disease. *Vet.Rec.* 90, 618-621.
71. Nardelli, L., E. Lodetti, G.L. Gualandi, R. Burrows, D.

- Goodridge, F. Brown, B. Cartwright, 1968: A foot-and-mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. *Nature* 219, 1275-1276.
72. Nossal, G.J.V., 1974: Principles of immunological tolerance and immunocyte receptor blockade. *Adv.Cancer Res.* 20, 93-130.
73. Pohlenz, J., D.M. Williams, H. Keller, 1974: Die Vesikulärkrankheit des Schweines bei ihrem Auftreten in der Schweiz. *Schweiz.Arch.Tierheilk.* 116, 413-422.
74. Prabhakar, B.S., M.A. Menegus, A.L. Notkins, 1985: Detection of conserved and nonconserved epitopes on Cocksackievirus B4: frequency of antigenic change. *Virology* 146(2), 302-306.
75. Richards, F.F., Konigsberg, W.H., Rosenstein, R.W., and Varga, J.M., 1975: On the specificity of antibodies. *Science* 187, 130-137.
76. Richtlinie des Rates vom 26.Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen, 64/432/EWG, Amtsblatt der EG Nr.121 S.1977, zuletzt geändert durch Richtlinie vom 22.09.87, 87/489/EWG, Amtsblatt der EG Nr. L.280, S.28.
77. Richtlinie des Rates vom 12. Dez. 1972 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit frischem Fleisch, 72/461/EWG, Amtsblatt der EG Nr. L302 S.24, zuletzt geändert durch Richtlinie vom 22.09.87, 87/489/EG, Amtsblatt der EG NR.L 280, S.28.
78. Roizman, B., M. Mayer, H. Rapp, 1958: Immunochemical studies of Poliovirus III. Further studies on the immunologic and physical properties of poliovirus particles produced in tissue culture. *J.Immunol.* 81, 419-425.
79. Rolle, M., A. Mayr, 1984: Enteroviren anderer Spezies. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler, Lehrbuch für Praxis und Studium. Herausgegeben von Anton Mayr, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 5. Auflage. 408-410.
80. Rowlands, D.J., M.W. Shirley, D.V. Sangar, F. Brown, 1975: A high density component in several vertebrate enteroviruses. *J.gen.Virol.* 29(2), 223-234.
81. Rubin, H., L. Fanshier, A. Cornelius, W.F. Hughes, 1962: Tolerance and immunity in chickens after congenital and contact

- infection with an avian leukosis virus. *Virology* 17, 143-156.
82. Rueckert, R.R., 1985: Picornaviruses and Their Replication. In: *Virology*. Ed.by Fields, B.N., D.N. Kribe, R.M. Chanock, J.L. Melnick, B. Roizman, R.E. Shope, ed. Raven Press, New York. 705-738.
 83. Schmidt, W.A., 1971: Untersuchungen über die Antigenkomponenten einiger Coxsackie- und ECHO-Viren und ihre Antikörper. *Arch. Ges.Virusforsch.* 33(1), 77-87.
 84. Schrader, J.W., and Nossal, G.J.V., 1974: Effector Cell Blockade A New Mechanism of Immune Hyporeactivity Induced By Multivalent Antigens. *J.Exp.Med.* 139, 1582-1598.
 85. Schrader, J.W., 1975: Effektor-cell blockade II. A demonstration of the reversible masking of an immune response by blockade of antibody-forming cells. *Eur.J.Immunol.* 5, 808-812.
 86. Schrater, A.F., E.A. Goidl, G.J. Thorbecke, G.W. Siskind, 1979: Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response to TNP-ficoll. I. Occurrence in AKR/J and BALB/c mice of hapten-augmentable, anti TNP plaque-forming cells and their accelerated appearance in recipients of immune spleen cells. *J.Exp.Med.* 150, 138-153.
 87. Schrater, A.F., E.A. Goidl, G.J. Thorbecke, G.W. Siskind, 1979: Production of auto-anti-idiotypic antibody during the normal immune response to TNP-ficoll. III. Absence in nu/nu mice: evidence for T-cell dependence of the anti-idiotypic-antibody response. *J.Exp.Med.* 150, 808-817.
 88. Sercarz, E., A.H. Coons, 1959: Specific inhibition of antibody formation during immunological paralysis and unresponsiveness. *Nature* 184, 1080-1082.
 89. Sercarz, E.E., and Coons, A.H., 1963: The absence of Antibody-Producing Cells During Unresponsiveness To BSA In The Mouse. *J.Immunol.* 90, 478-491.
 90. Slotnick, V.B., 1971: Immunological Tolerance to Influenza Virus in Mice. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 181, 196-201.
 91. Straub O.C., K. Bögel, 1964: Untersuchungen über die Seroverwandtschaft von bovinen Vaginitis- und Enteroviren. *Zbl. Vet.Med.* 11(B), 365-372.
 92. Straub O.C., 1965: Isolierung eines bovinen Enterovirus aus dem Genitaltrakt. *Dt.tierärztl.Wschr.* 72, 54-55.

93. Strayer, D.S., H. Cosenza, W.M.F. Lee, D.A. Rowley, H. Köhler, 1974: Neonatal Tolerance induced by antibody against antigen-specific receptor. *Science* 186, 640-643.
94. Talmadge, D., 1959: Immunological specificity. *Science* 129, 1643-1648.
95. Tierseuchengesetz vom 28.03.1980 in BGBl. 1980, 1, I, S.386ff.
96. Thorpe, R., P.D. Minor, A. Mackay, G.C. Schild, M. Spitz, 1982: Immunochemical studies of Polioviruses: Identification of Immunoreactive Virus Capsid Polypeptides. *J.gen.Virol.* 63, 487-492.
97. Tsuda T., T. Tokui, T. Onodera, 1986. Induction of Neutralizing Antibodies by Structural Proteins VP1 and VP2 of Swine Vesicular Disease Virus. *Jpn.J.Vet.Sci.* 49(1), 129-132.
98. Volkert, M., C. Lundstedt, 1971: Tolerance and Immunity to the Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 181, 183-195.
99. Vorschriften und Bestimmungen zur Bekämpfung von Tierseuchen im Inland, Sperrbezirksverordnung vom 27.Juli 1987, BGBl. 1987, 1, I, S. 1710ff.
100. Weigle, W.O., 1971: Recent Observations And Concepts In Immunological Unresponsiveness And Autoimmunity. *Clin.exp.Immunol.* 90, 437-447.
101. Wenner, H. A., A.M. Behbehani, 1968: Echoviruses. *Virol.Monogr.* 1, 1ff.
102. Witte, K.H., D. Prager, H.-A. Schoon, J. Wicke, B. Hertrampf, 1986: Durch porcines Enterovirus 2 verursachte verlustreiche Polioenzephalomyelitis in einem Schweinemastbestand. *Berl.Münch. Tierärztl.Wschr.* 99, 121-126.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Volker Ohlinger für die Bereitstellung des Themas, seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich beim Präsidenten der Bundesforschungsanstalt Herrn Direktor und Professor Dr. G. Wittmann für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut und die Begutachtung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. Heinz-Jürgen Thiel bedanken, der durch konstruktive Ratschläge einen wesentlichen Teil zu der Fertigstellung der Arbeit beigetragen hat.

Ferner danke ich Herrn Dr. Günther Keil für die Einführung in die Methode der Radioimmunpräzipitation und Herrn Dr. Eberhardt Pfaff für die Diskussion der Ergebnisse.

Bei Frau P. Bogenschütz bedanke ich mich für die technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente, bei Herrn P. Schröter und Herrn R. Straub für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr an der Universität München bedanke ich mich für die herzliche Betreuung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Name: Andrea Metzger

Geburtsdatum: 13.07.1962

Geburtsort: Albstadt-Tailfingen

Eltern: Hermann Metzger und Rosl Metzger, geb. Straubinger, Straßberg

Schul Ausbildung: 1968-1972 Grund- und Hauptschule Straßberg
1972-1981 Wilhelm-Hauff-Gymnasium in Albstadt-Ebingen, Abschluß: Abitur

Studium: 1981-1982 Freie Universität Berlin Studiengang Tiermedizin
1982-1987 Ludwig-Maximilians-Universität München Studiengang Tiermedizin
28.07.1987 Approbation

Dissertation: 1987-1989 Anfertigung der vorliegenden Dissertation an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, Institut für Impfstoffe

